

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Gabriela Fuxová**

## **Ovlivnění genetické diverzity rákosových porostů strukturou říčních systémů**

**Impact of river system structure on the genetic diversity  
of reed populations**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Praha, 2011

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. srpna 2011

Gabriela Fuxová

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli, Tomáši Férovi, za vedení práce, všechny připomínky, rady a návrhy při psaní práce, za konzultace a poskytnutou literaturu.

Poděkovat bych chtěla i Veronice Machalové, která mi pomohla při prvních laboratorních analýzách a Lence Flaškové, bez jejíchž rad ohledně úprav laboratorních postupů by byla efektivita mé práce i počet analyzovaných vzorků velmi nízké.

Děkuji také svým spolužákům za velkou psychickou podporu a trpělivost při odpovídání na všechny mé dotazy.

Stejný dík patří i mým přátelům, kteří se mnou trpělivě jezdili na výlety „za rákosím“, byli ochotni přijmout fakt, že rákos nejsou „doutníky“, a vozili mi vzorky i ze svých dovolených.

Zvláštní poděkování patří mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala jak materiálně, tak psychicky.



Obrázek 1: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (Zdroj: [http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/thome/band1/tafel\\_065\\_small.jpg](http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/thome/band1/tafel_065_small.jpg))

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Abstrakt .....                                       | 6  |
| Klíčová slova .....                                  | 6  |
| Abstract .....                                       | 7  |
| Key words .....                                      | 7  |
| <br>   |    |
| 1 Úvod .....   | 8  |
| 1.1 Otázky .....                                     | 9  |
| <br>   |    |
| 2 Literární rešerše .....                            | 10 |
| 2.1 Biogeografie .....                               | 10 |
| 2.1.1 Šíření rostlin .....                           | 10 |
| 2.1.2 Způsoby studia šíření rostlin .....            | 11 |
| 2.1.3 Využití molekulárních markerů .....            | 12 |
| 2.1.3.1 Mikrosatelity .....                          | 13 |
| 2.1.3.2 Statistické zpracování dat .....             | 14 |
| 2.1.3.3 Polyploidie .....                            | 15 |
| 2.2 Říční síť, hydrochorní rostliny, klonalita ..... | 17 |
| 2.3 Rákos obecný .....                               | 20 |
| <br>   |    |
| 3 Metodika .....                                     | 24 |
| 3.1 Sběr vzorků v terénu .....                       | 24 |
| 3.2 Laboratorní zpracování dat .....                 | 27 |
| 3.3 Vyhodnocení primárních dat .....                 | 28 |
| <br>   |    |
| 4 Výsledky .....                                     | 32 |
| 4.1 Klonální struktura populací .....                | 35 |
| 4.2 Analýza molekulární variance (AMOVA) .....       | 38 |
| 4.3 Analýza fylogenetické příbuznosti .....          | 40 |
| 4.4 Shlukování jedinců podle PCoA .....              | 44 |
| 4.5 Bayesovské shlukování .....                      | 48 |
| 4.6 Shlukování podle programu Structure .....        | 53 |
| 4.7 Vztah genetické a geografické vzdálenosti .....  | 58 |

|  |     |
|--|-----|
| 5 Diskuze .....  | 63  |
| 5.1 Klonální struktura populací .....                              | 63  |
| 5.2 Vztahy mezi populacemi .....                                   | 66  |
| 5.2.1 Genetická diferenciace jednotlivých populací a oblastí ..... | 66  |
| 5.2.2 Geografická vzdálenost a genetická podobnost .....           | 69  |
| 6 Závěr .....  | 71  |
| Literatura .....   | 73  |
| A Přehled lokalit .....  | 90  |
| A.1 Přehled všech lokalit .....                                    | 90  |
| A.2 Přehled říčních lokalit .....                                  | 94  |
| A.3 Přehled lokalit z vybraných geografických oblastí .....        | 95  |
| B Protokoly .....  | 97  |
| B.1 Izolace DNA metodou CTAB .....                                 | 97  |
| B.2 Polymerase chain reaction (PCR) .....                          | 98  |
| B.3 Přesrážení mikrosatelitových produktů .....                    | 100 |
| B.3.1 Přesrážení jednotlivých vzorků .....                         | 100 |
| B.3.2 Přesrážení v platu .....                                     | 100 |
| C Jednotlivé běhy programu Structure .....                         | 102 |
| C.1 Výstup ze Structure pro 5 skupin .....                         | 102 |
| C.2 Výstup z Structure pro 4 skupiny .....                         | 104 |
| D Primární data .....  | 106 |
| D.1 Datová matice pro multiplex I .....                            | 106 |
| D.2 Datová matice pro multiplex II .....                           | 111 |

## Abstrakt

Řada rostlinných druhů je vázána na biotopy související s říčním prostředím nebo krajinou ovlivňovanou řekami. Říční systémy vytváří v ekosystémech významné lineární koridory a přímo nebo nepřímo ovlivňují rozšíření řady druhů v krajině. Nabízí se tak řada otázek ohledně šíření druhů v tomto prostředí. Jednou z možností, jak hledat odpovědi na tyto otázky, je využití molekulárních metod.

Pomocí 10 mikrosatelitových jaderných primerů byla provedena analýza 202 vzorků rákosu obecného ze 60 populací České republiky. Tato analýza umožnila odhalit příbuzenské vztahy mezi jedinci, získat informace o prostorovém rozložení populací a šíření rákosu obecného.

*Phragmites australis* tvoří jak monoklonální populace, tak populace tvořené z několika klonů. Byla odhalena závislost míry klonality na prostředí, ve kterém se populace nachází. Populace rostoucí na březích řek byly spíše monoklonální, rybníční polyklonální.

Jednotlivé populace vykazují vysoký stupeň izolovanosti. Nejvyšší procento variability bylo vysvětleno na mezipopulační úrovni, což je běžné u druhů lehce šířitelných větrem. Dochází ke komunikaci mezi populacemi, ve větší míře na krátké vzdálenosti. Mezi populacemi byl nalezen důkaz vegetativního šíření na krátké vzdálenosti, mnohem častěji ale dochází ke generativnímu šíření. K šíření na velké vzdálenosti dochází prostřednictvím generativních diaspor (semen), které se mohou šířit jak v rámci řeky, tak mezi řekami a mezi různými oblastmi, nejspíše anemochorně, ale nemůžeme vyloučit ani šíření ptáky nebo člověkem.

Populace vykazují genetickou izolovanost geografickou vzdáleností (isolation by distance), pozitivní autokorelace je detekovatelná do přímé vzdálenosti zhruba 2 km.

## Klíčová slova

anemochorie, Česká republika, dálkové šíření, disperze, ekologie, genetická diverzita, hydrochorie, klonalita, migrace, mikrosatelity, molekulární metody, *Phragmites australis*, pobřežní rostliny, rákos obecný, rozmnožování, říční systémy, SSRs, vodní rostliny

## Abstract

Many plant species are closely related to river biotopes or to biotopes influenced by rivers. River systems create important linear corridors in ecosystems and directly or non-directly influence spatial spread of species in these environments. This offer many questions about species spread in this system. We can answer these questions by using molecular methods.

Using 10 microsatellite (SSRs) primers, 202 individuals of *Phragmites australis* from 60 populations were analysed. Those analyses allowed reveal kinship of individuals, obtain information about spatial spread of populations and about spreading of common reed.

*Phragmites australis* creates both - monoclonal and polyclonal - populations. Dependence of rate of clonality on environment was revealed. Populations from river banks are more monoclonal, populations from pond shores are more polyclonal.

Populations are isolated. The highest percentage of variability was explained on among-population level. This is common for anemochoric species. Communication between populations is present, more on shorter distances.

Evidence for vegetative spread was found on short distance. Generative spread is much more common. Long-distance spreading is mediated by generative diaspores – seeds. This spreading includes within-river spread, among-river spread and spreading between different areas. It is mediated probably by wind, but we cannot exclude birds or human spread.

Common reed shows isolation by distance. There is significant positive autocorrelation among individuals up to 2 km of straight distance.

## Keywords

anemochory, clonality, common reed, Czech republic, dispersal, long distance dispersal, ecology, genetic diversity, hydrochory, migration, microsatellites, molecular methods, *Phragmites australis*, river corridor plants, river systems, SSRs, water plants



# Kapitola 1

## Úvod

Šíření rostlin je jedním z hlavních procesů evoluce a dynamiky rostlinných populací (Ouborg et al., 1999). Prostorové uspořádání v rámci ekosystému je dáno z velké části pohybem semen. Na regionální úrovni může pohyb semen dokonce určovat míru kolonizace nových prostor či naopak extinkci některých populací (Brown et Kodric-Brown, 1977).

Jednou z možných metod vedoucích k zodpovězení otázek týkajících se šíření a rozšíření rostlin jsou molekulární techniky studující DNA, které zjišťují příbuznost studovaných jedinců a z ní odvozují historii šíření a rozšíření druhu ve studovaném území. Tyto metody byly využity například v pracích zabývajících se postglaciální rekolonizací Evropy (Comes et Kadereit, 1998), invazemi (Pairen et al., 2006) nebo vzácnými druhy (Schönswetter et al., 2004).

K využití molekulárních metod dochází i v rámci studia vodních rostlin. Vodní prostředí vykazuje určitá specifika oproti souši. Například řeky a jejich přítoky tvoří lineární koridory s jednosměrným vektorem šíření. Šíření mezi jednotlivými toky nebo proti proudu je tak pro rostliny, které nejsou primárně zoochorní nebo anemochorní, relativně obtížné. Řeky tak buď přímo nebo nepřímo ovlivňují rozšíření těchto druhů v krajině a umožňují jim také šíření za pomoci tekoucí vody na lokality ležící níže po proudu.

Jako modelový druh jsem si pro svou práci vybrala rákos obecný (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud, který je vázán na vlhké prostředí a tvoří rozsáhlé klonální porosty (Marks et al., 1993). Roste na březích tekoucích i stojatých vod a ve vlhkých prohlubních, je proto vhodným modelem pro studium obecných procesů šíření pobřežních rostlin v říčních systémech. Jeho studiem se můžeme dozvědět něco o obecnějším fungování ekologicky srovnatelných druhů na krajinné úrovni. V České republice je rozšířen celkem hojně, především na březích řek a vodních nádrží, stále častěji se s ním můžeme setkat podél silnic a železnic a ve vlhkých prohlubních např. u polí. Pro rákos jsou k dispozici mikrosatelitové jaderné primery (Saltonstall, 2003), což nám umožňuje spolehlivě odhalit příbuznost mezi studovanými jedinci a zodpovědět tak položené otázky. Práce navazuje na studii Fér et Hroudová (2008), která se zabývala genetickou diverzitou a šířením rákosu v malém říčním systému Cidliny, Mrliny a přilehlých částí Labe.

## 1.1 Otázky

K dispozici byl 575 vzorků z 60 populací rákosu obecného z celé České republiky, z nichž bylo zpracováno 202 jedinců mikrosatelitovou analýzou. Cílem práce bylo získat informace o genetické variabilitě populací a interpretací rozložení genetické diverzity odpovédět na následující otázky:

1. Jaká je genetická struktura populací? Jsou spíše monoklonální nebo obsahují více klonů?
2. Liší se geneticky populace rákosu obecného v rámci řek, mezi řekami nebo mezi jednotlivými oblastmi ČR?
3. Dochází k transportu generativních nebo vegetativních diaspor v rámci řeky? Dochází k transportu mezi jednotlivými povodími? Dochází k transportu na větší vzdálenosti?
4. Jaký vliv má říční systém na formování nových populací? Vyskytují se rozdíly v počtu klonů mezi populacemi z řek a z rybníků?
5. Jaký je vztah geografické vzdálenosti mezi jedinci a genetické podobnosti jedinců? Na jakou vzdálenost jsou jedinci pozitivně autokorelování? Dochází ke genetické izolaci geografickou vzdáleností?

## Kapitola 2

### Literární rešerše

Šíření rostlin je již dlouhou dobu velmi studovaným odvětvím botaniky (Ridley, 1930; Willson et Traveset, 2000). Je to jeden z hlavních procesů evoluce a dynamiky rostlinných porostů (Ouburg et al., 1999). Rostliny jsou sesilní organismy, a proto ke svému šíření a pohybu z místa na místo využívají reprodukční fáze životního cyklu, kdy tvoří diaspory, které jsou šířeny různými dispersními vektory a mohou dát vznik novému jedinci (Sernader, 1906 sec. Müller-Schneider et Lhotská 1971). Díky tomu nejsou rostliny vázané pouze na stávající lokalitu, ale mohou invadovat i do vzdálených míst.

### 2.1 Biogeografie

Nejen u rostlin studuje tyto jevy biogeografie (nauka o šíření a rozšíření organismů).

Snaží se odpovědět na otázku, zda je momentální rozšíření a početnost organismů dána ekologickými vztahy mezi organismy, jejich fyziologickými nároky, nebo má svůj vliv rozšíření organismu v minulosti a jeho schopnost šíření. Ve výsledku definuje obecné vzorce šíření jednotlivých druhů za použití ekologických, fyziologických i historických údajů. Krom obecných zákonitostí ovšem biogeografie popisuje i jedinečné události, ke kterým došlo a které jsou ve stejné podobě neopakovatelné (pěnkavy na Galapágách; Komárek, 1997; Brown et Lomolino, 1998).

#### 2.1.1 Šíření rostlin

Problematika šíření rostlinných druhů v krajině je zcela specifická. Rostliny nejsou schopny aktivního pohybu (jsou tzv. sesilní) a využívají ke svému šíření v prostoru reprodukční fázi svého životního cyklu. V tomto období tvoří diaspory, části oddělené od rostliny schopné dát vznik novému jedinci, které jsou následně za pomoci některého z dispersních vektorů šířeny i do velmi širokého okolí (Sernader, 1906 sec. Müller-Schneider et Lhotská, 1971).

Diaspory mohou být různého původu. Vegetativní (výběžky – nadzemní i podzemní, pupeny, hlízy, turiony, pacibulky) zajišťují především posílení populace na dané lokalitě, kde již bylo nalezeno ekologické optimum a je tudíž pro rostlinu prioritou zabrat co největší prostor a není potřeba hledat nové niky pomocí generativního množení (Eriksson, 1992). V mnoha případech se ale vegetativní diaspora oddělí od rostliny

a na novém stanovišti dá vznik identické rostlině. Generativní diasporý slouží ke kolonizaci nových míst dceřinými organismy. Výhodou je vyšší genetická variabilita a tím i širší spektrum ekologicky vhodných stanovišť. Dochází ke vzniku spor, semen, plodů.

Oba druhy diaspor jsou šířeny dispersními vektory – větrem (anemochorie), vodou (hydrochorie), zvířaty (zoochorie), člověkem (antropochorie) atd. (Ridley, 1930). V průběhu evoluce rostlin se vyvinula celá řada adaptací usnadňující pohyb pomocí daného vektoru (Willson et Traveset, 2000). V této práci se budu zabývat dvěma typy šíření – anemochorií a hydrochorií.

Adaptace rostlin k anemochorii spočívají především ve tvorbě létacích aparátů (chmýrů, křídel) z krycích pletiv semene (Begon et Harper, 1997). Touto investicí se snižuje hmotnost semene a to i na úkor zásobních pletiv (potřebných při klíčení). Létavost diasporý (tzv. terminal velocity) závisí na vybalancování poměru morfologických adaptací a hmotnosti semene (Begon et Harper, 1997). Výhodou je možnost šíření na opravdu velké vzdálenosti (při větších poryvech; Bullock et Clark, 2000).

Hydrochorní rostliny jsou typicky druhy osidlující vodní, pobřežní a mokřadní ekosystémy. Investují do zvýšení plovatelnosti semen, uzpůsobení dormance specifickým podmínkám, přizpůsobení semen ke klíčení ve vodě i pod vodou (Fér, 2000). Hydrochorie není taxonomicky určena, vyvinula se nezávisle u mnoha skupin rostlin (Johansson et al., 1996; van der Pijl, 1982). Výhodou hydrochorie (oproti například anemochorii) je stabilita podoby vektoru – diasporý se dostanou na místo velmi podobné původní lokalitě a tudíž vhodné pro jejich vyklíčení (Schneider et Sharitz, 1988).

### **2.1.2 Způsoby studia šíření rostlin**

Šíření rostlin výše zmíněnými vektory lze studovat několika způsoby. Metody lze rozdělit do 4 skupin, které se od sebe liší přístupem, ve výsledku ale všechny zjišťují intenzitu i směr šíření rostlin a vzájemně se mohou doplňovat.

Přímé sledování procesu šíření diaspor od rodičů po semenáčky je asi nejpřesnější metodou, ovšem jedná se o velmi náročný design. V praxi se používají označené náhražky semen, které se například pustí do vody a sleduje se jejich cílová lokalita (např. Nilsson et al., 1991).

Méně obtížné jsou pokusy, při kterých dochází k zachycování semen do pastí a následné zkoumání složení v závislosti na charakteristice okolí (např. Fér, 2000; Říčařová, 2011). Nevýhodou této metody je nejspolehlivost zdroje těchto semen.

Na základě již známých údajů od jiných druhů o šíření můžeme zkonstruovat matematické modely. Lze takto předpovědět šíření dalších druhů s podobnou ekologií a v podobných podmínkách, jako u druhů, které byly použity při tvorbě a kalibraci modelů (Jacobs et Macisaac, 2009; Cain et al, 1998).

Poslední metodou je využití molekulárních technik studujících DNA k získání informací o příbuznosti jedinců ve zvoleném systému. Jedná se o metodu, která může být nepřímá, kdy studuje historický genový tok. Můžeme sledovat nejrozličnější časoprostorové škály a tvořit modely šíření a rozšíření rostlin (Ouburg et al., 1999). Touto metodou lze studovat šíření a příbuznost starých linií (Wanntorp et Wanntorp, 2003) i mapovat recentní invaze (Thiébaud, 2007). Přímou lze molekulárními metodami studovat aktuální genový tok například pomocí parentage analýzy diaspor nebo semenáčků, ke kterým jsou hledáni rodiče.

### **2.1.3 Využití molekulárních markerů**

Nevýhodou přímých metod, krom náročnosti zachování podmínek prostředí a náročné metodiky, je nepřesnost získaných dat. Vykazují totiž vysoký podíl šíření na krátkou vzdálenost a velice málo dálkových přenosů (Ouburg et al., 1999). S tvrzením, že dálkové přenosy jsou jen něco náhodného, ovšem nesouhlasí experimentálně určená míra osidlování nových prostor (Cain et al., 1998).

Jednou z možností, jak vyřešit problematiku rozdílnosti šíření na krátké a dlouhé vzdálenosti a postihnout oba tyto jevy, je využít spojení ekologických a populačně genetických metod (Silvertown, 1991). Šíření jedinců a genetický tok, který je v tomto případě předmětem studia (místo toku propagulí u přímých metod), jsou úzce spojeny. A právě na rozdílnosti genetických informací vzniklých z velké části náhodným genetickým driftem selektivně neutrálních alel (Hartl et Clark, 1997) jsou postaveny moderní molekulární markery.

Za marker je považována cíleně vybraná část celkové informace, znak, který vypovídá o příbuznosti daného souboru vzorků, ať už jedinců, populací nebo druhů. Může se jednat o marker fenotypového (znaky na hrachu u Gregora Mendela) nebo genotypového typu. Molekulární markery představují informace získané na základě analýz DNA nebo proteinů. Předpokladem pro úspěšnou analýzu pomocí těchto markerů je především vhodný výběr části informace – nejlépe takové, která nemá vliv na fitness jedince a je tedy selektivně neutrální (například nekódující úseky DNA, které nejsou pod selekčním tlakem a mohou se zde hromadit mutace; Baker, 2000). Ideální marker

je polymorfní, rovnoměrně rozmístěný v celém genomu, poskytující adekvátní vysvětlení genetických rozdílů, je spolehlivý, jednoduchý, levný, rychlý, k analýze potřebuje co nejmenší vzorek DNA, má vazbu na různé fenotypy a nevyžaduje žádnou předchozí informaci o genomu či organismu (Agarwal et al., 2008). Tato kritéria zatím bohužel nespĺňuje žádný z vyvinutých markerů, proto je dnes k dispozici celá škála molekulárních markerů lišících se v různých ohledech (tab. 1), ze kterých je nutno vybrat pro každou studii ten „nejvhodnější“ (Sun et al., 1999).

Pro studium šíření rostlin se nejčastěji používá tzv. intronů, tedy částí genetické informace, které nejsou překládány do proteinů (Ouburg et al., 1999), nebo tzv. spacers, nekódující části DNA ležící mezi dvěma tandemově se opakujícími geny. Nejčastějším molekulárním markerem pro řadu analýz je chloroplastová DNA (cpDNA; Baker, 2000; McCauley, 1995). Vykazuje konzervativnost a relativně nízkou variabilitu, kterou lze (např. pro studia na menší časoprostorové škále) vyvážit použitím variabilních markerů typu AFLP nebo mikrosatelitů.

Tabulka 2.1: srovnání nejčastěji používaných molekulárních markerů (Agarwal et al. 2008)

RFLP restriction length polymorphism, RAPD random amplified polymorphic DNA, SSR simple sequence repeats (mikrosatelity), SSCP single strand conformational polymorphism, CAPS cleaved amplified polymorphic sequence, SCAR sequence characterized amplified region, AFLP amplified fragment length polymorphism, IRAP/REMAP inter-retrotransposon amplified polymorphism/retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

|            | množství | reproduko-<br>vatelnost | stupeň<br>polymorfismu | lokusová<br>specifita | technické<br>požadavky | množství<br>potřebné DNA | hlavní použití                    |
|------------|----------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| RFLP       | vysoké   | vysoká                  | střední                | ano                   | vysoké                 | vysoké                   | fyzické mapování                  |
| RAPD       | vysoké   | nizká                   | střední                | ne                    | nizké                  | nizké                    | genové značení                    |
| SSR        | střední  | střední                 | střední                | ne                    | střední                | nizké                    | genetická diverzita               |
| SSCP       | nizké    | střední                 | nizký                  | ano                   | střední                | nizké                    | SNP mapování                      |
| CAPS       | nizké    | vysoká                  | nizký                  | ano                   | vysoké                 | nizké                    | alelická diverzita                |
| SCAR       | nizké    | vysoká                  | střední                | ano                   | střední                | nizké                    | genové značení a fyzické mapování |
| AFLP       | vysoké   | vysoká                  | střední                | ne                    | střední                | střední                  | genové značení                    |
| IRAP/REMAP | vysoké   | vysoká                  | střední                | ano                   | vysoké                 | nizké                    | genetická diverzita               |
| RAMPO      | střední  | střední                 | střední                | ano                   | vysoké                 | nizké                    | genetická diverzita               |

### 2.1.3.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity (SSRs, Simple Sequence Repeats; Jarne et Lagoda, 1996; Balloux et Lugon-Moulin, 2002; Slatkin, 1995) jsou tandemově se opakující repetice 1 až 6 bazí (např. ...ATATATATATAT...) nacházející se v eukaryotických i prokaryotických genomech, převážně v nekódujících oblastech DNA (Metzgar et al., 2000). Vznikly nejspíše sklouznutím DNA polymerázy při kopírování DNA (Schlötteter et Tautz, 1992).

Jedná se o velmi variabilní markery s relativně vysokou mutační rychlostí ( $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  na lokus a generaci; Tautz, 1989), které dávají dostatek variability i pro populační

studie na menší časoprostorové úrovni a díky jejich kodominantnímu charakteru můžeme odlišit heterozygoty od dominantních homozygotů. Jednotlivé alely jsou určeny počtem opakování dané repetice v rámci alely – délkovým polymorfismem. Ten lze vizualizovat oddělením různě dlouhých alel za pomoci elektroforézy.

Nevýhodou tohoto markeru je jeho neuniverzálnost. Každý druh má kolem mikrosatelitů specifickou sekvenci nukleotidů (tzv. flanking regions), které repetici ohraničují. Pro každý druh je tedy třeba vyvinout nový specifický pár primerů pro PCR reakci (Zane et al., 2002) – ať už sekvenací genomu, nebo využitím primerů vyvinutých pro blízce příbuzný druh metodou cross-amplifikace, přičemž úspěšnost logicky klesá s fylogenetickou vzdáleností (Scribner et Pearce, 2000). V rostlinné říši se nejčastěji využívá jaderných nebo plastidových mikrosatelitů (Provan et al., 2001)

### **2.1.3.2 Statistické zpracování dat**

Informace získané na základě molekulárních metod musí být dále zpracovány statistickými metodami. Můžeme sledovat například počty a frekvence alel ve studovaném vzorku. Za pomoci kodominantních markerů lze na základě frekvence sdílených alel zjišťovat genetickou vzdálenost mezi jedinci – například pomocí párové genetické vzdálenosti Nei's chord distance (Nei et al., 1983). Matice vzdáleností potom slouží jako vstupní soubor pro další analýzy.

Pro zjištění genetické struktury dat, k vyjádření prostorových vztahů mezi jedinci a populacemi, lze využít dvou typů analýz – hierarchických a nehierarchických. K nehierarchickým metodám patří Bayesovské klastrování jedinců (Corander et Marttinen, 2007; Falush et al., 2003) nebo mnohorozměrná metoda PCoA (principal coordinate analysis). Bayesovské klastrování zjišťuje nejpravděpodobnější model rozdělení jedinců do určitého počtu klastrů – předem určeného (např. program BAPS 3.2) nebo předem neurčeného (např. program Structure). Toto číslo odpovídá optimálnímu počtu klastrů/populací, do kterých jsou všichni jedinci rozděleni. Metoda PCoA redukuje původně  $n$ -rozměrný prostor molekulárních znaků do 2 nebo 3 rozměrů. K hierarchickým zobrazením genetické struktury patří například shlukovací metoda neighbour joining nebo Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (average linkage method, UPGMA). Tyto metody jsou ovšem nepoužitelné, pokud je mezipopulační struktura slabá a dochází ke shodě pravděpodobností několika řešení.

K popisu rozdělení genetické variability v rámci populací a mezi populacemi/oblastmi se využívají například analýza molekulární variance (AMOVA, Excoffier et al., 1992) nebo F-statistika (Weir et Cockerham, 1984). Obě tyto metody nám říkají, jak mezi sebou populace komunikují – zda jsou izolované, nebo mezi nimi dochází k výměně genetické informace, jestli má ta která populace unikátní alely, nebo jsou všechny alely ve většině populací. Lze je počítat na základě podílu shodných alel ( $F_{ST}$ -like; Weir et Cockerham, 1984), nebo na základě čtverců rozdílu délek alel ( $R_{ST}$ -like; Kimura et Wiess, 1964).

Ke zjištění genetické izolace geografickou vzdáleností (isolation by distance) se využívá analýz prostorové autokorelace. Zde zjišťujeme, do jaké vzdálenosti jsou si jedinci signifikantně geneticky podobní (Hardy et Vekemans, 2002). Tato zjištění se následně mohou znázornit pomocí geografických informačních systémů.

### 2.1.3.3 Polyploidie

Problematické je vyhodnocování dat polyploidních druhů. Polyploidie je významným evolučním procesem v rostlinné i živočišné říši. Řada studií prokázala, že zdvojování genomu (opakovaná polyploidizace) je přítomné v evoluci velké části eukaryotních organismů (Lundin, 1993; Sidow, 1996) a je významným evolučním procesem. Podle způsobu vzniku jedinců rozlišujeme autopolyploidii a allopolyploidii (Kihara et Ono, 1926; Grant, 1981). Autopolyploid vzniká zpravidla uvnitř druhů (Soltis et Riesenberga, 1986) znásobením téže chromosomové sady (máme-li na začátku diploida, vznikne nám autotetraploid;  $AA \rightarrow AAAA$ ) například působením tepelného šoku v průběhu mitosy (chromosomy se nerozestoupí do dvou buněk) nebo splynutím neredukovaných buněk ( $AA+AA$ ) (Briggs et Walters, 2001). Allopolyploidi vznikají křížením jedinců různých druhů splynutím nestejných chromosomových sad (Soltis et Riesenberga, 1986), kdy vzniklý neplodný hybrid může vytvořit malé procento neredukovaných gamet a tím i polyploidní větev, která už plodná je ( $AA, BB \rightarrow AB$  neplodný hybrid  $\rightarrow AABB$ ; Briggs et Walters, 2001).

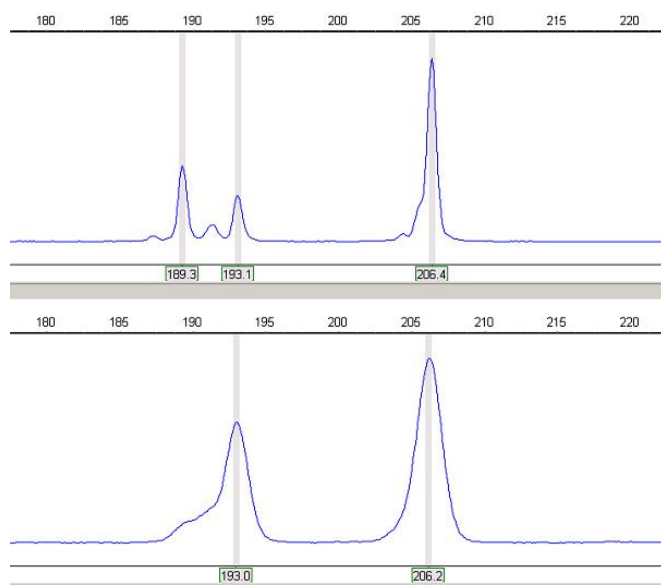
Variabilita zjišťovaná za pomoci mikrosatelitových markerů je založena na počtu opakování dané sekvence a tím pádem na délce PCR produktů. U diploidních jedinců tedy rozlišujeme dva stavy – dvě délky alely označují heterozygota, jedna délka alely pak homozygota. U polyploidních jedinců se situace komplikuje, protože nejsme schopni určit



četnost jednotlivých alel ve vzorku. Pokud například u allotetraploida objevíme fenotyp AB, nevíme, zda se jedná o genotyp ABAA, ABAB nebo ABBB (Markwith et al., 2006).

S touto problematikou je třeba se vypořádat zejména kvůli statistickým programům, kde mohou chybějící data velmi často znamenat neprůkazné výsledky (a které mnohdy ani neumí s neúplně určenými allopolyploidními vzorky pracovat). V tuto chvíli máme několik možností, jak postupovat při tvorbě datové matice. V této práci budou použity následující postupy.

Becher et al. (2000) využil skórování každé zjištěné alely (tedy každé zjištěné délky PCR produktu) jako přítomné či nepřítomné v daném vzorku. Výslednou binární matici dat lze v tomto případě zpracovávat technikami vyvinutými pro dominantní markery. Saltonstall (2003) použila „diploidní model“ skórování. U tetraploida to znamená v případě výskytu pouze 2 nebo 3 alel v lokusu označení ostatních za chybějící, přestože mohly být přítomny jako kopie. V tomto případě dochází ke ztrátě variability tvořené například výskytem dvou alel v poměru 1:3.



Becher et al. (2000):

| alela     | 189 | 193 | 207 |
|-----------|-----|-----|-----|
| jedinec 1 | 1   | 1   | 1   |
| jedinec 2 | 0   | 1   | 1   |

Saltonstall (2003):

|           | lokus 1 |     |     |   |
|-----------|---------|-----|-----|---|
| jedinec 1 | 189     | 193 | 207 | ? |
| jedinec 2 | 193     | 207 | ?   | ? |

(? – chybějící data)

Obrázek 2.1: Ukázka analýzy primárních dat v programu GeneMarker dvěma různými způsoby – podle Becher et al. (2000) a podle Saltonstall (2003).

Ani jedna z výše uvedených metod není ideální a dochází ke ztrátě části informace. Částečné řešení nabízí program Tetrasat (Markwith et al., 2006), který se snaží využít všech dostupných informací o vzorku. Program si podle počtu zadaných alel dodá do matice všechny ostatní možné kombinace lokusu, se kterými dále pracuje. Bohužel ho nelze použít pro větší množství vzorků a lokusů a nelze ho použít pro allopolyploidní druhy.

## 2.2 Říční síť, hydrochorní rostliny, klonalita

Řeky představují v krajině významný lineární koridor, který zasahuje do ostatních ekosystémů a hraje významnou roli při přísunu bioty, vytváření habitatů (Cummins et al., 1989) a při šíření diaspor rostlin v okolí. Tento vektor hydrochorního šíření je specifický polarizovaným tokem diaspor závislým na vodním proudu (Johansson, 1996) a trvale determinovanými migračními cestami (Fér, 2000). Řeky spojují pomocí tekoucí vody všechna místa vhodná k vyklíčení šířených diaspor (Schneider et Sharitz, 1988). Také časté disturbance říčních břehů tvoří vhodná místa pro vznik nových populací. Na tento specifický biotop je vázána řada druhů (Burkart, 2001) a řeky ovlivňují jejich rozšíření a šíření.

Prakticky každá rostlina má možnost být šířena vodou, ale některé druhy na tomto principu staví svoji disperzní strategii (Fér, 2000). Mají vyvinuty mechanismy umožňující efektivnější využití vektoru – proudění vody, například investice do plovatelnosti semen, uzpůsobení dormance, přizpůsobení klíčení semen ve vodě či pod vodou (Fér, 2000). Hydrochorie se vyvinula u mnoha skupin rostlin zcela nezávisle (Johansson et al., 1996; van der Pijl, 1982). Tyto rostliny ovšem často využívají i jiných vektorů (zoochorie – šíření zvířaty, ptáky; Green et al., 2002; Mueller et van der Valk, 2002; Figuerola et al., 2005; anemochorie – šíření větrem) k šíření proti proudu, aby nedocházelo k odplavení druhu, případně k šíření mezi různými řekami a jejich přítoky.

V tomto specifickém prostředí se nabízí řada otázek genetického, geografického i fyziologického rázu. Podíváme-li se například na studie týkající se dálkového šíření druhů, bylo u většiny druhů potvrzeno (Kudoh et Wigham, 1997; Russell et al., 1999; Lundquist et Andersson, 2001; Keller, 2000; Lamote et al., 2002; Pollux et al., 2007; Fér, 2008). U některých druhů bylo omezeno na kratší vzdálenosti (Araki et Kunii, 2006; Liu et al., 2006; Markwith et Scanlon, 2007; Prentis et Mather, 2008), vyloučeno bylo jen u několika málo druhů (Li et al., 2004). V České republice se touto otázkou zabýval Fér (2008), který ve studii srovnával rostliny s různými hydrochorními adaptacemi v rámci povodí Cidlina, Mrliny a části Labe. Potvrdil, že řeka je pro vodní rostliny důležitým vektorem, jedinci jsou si podobní až do vzdálenosti 30 km, přičemž rostliny s vyšší mírou hydrochorie (*Sparganium erectum*, *Nuphar lutea*) se šířily na větší vzdálenosti.

Další možnou otázkou je šíření rostlin mezi jednotlivými řekami - nakolik jsou od sebe jednotlivá povodí geneticky oddělená (Johansson et al., 1996; Fischer et al., 2000)? Fér et Hroudová (2009) zkoumali šíření rákosu v rámci již zmíněného povodí

Cidliny, Mrliny a Labe. Z rozložení dat získaných na základě Bayesovského clusterování lze doložit nejen šíření podél jednoho koryta, ale i šíření větrem mezi jednotlivými toky. Bohužel studií zabývajících se touto problematikou zejména na větších územích je málo.

S jednosměrným tokem řeky souvisí i otázka genetické diverzity. Je větší genetická diverzita populací na horním nebo dolním toku řeky (Nilsson et al., 1989)? Teoreticky by mělo docházet ke splavování diverzity k dolní části toku, Gornall et al. (1998) potvrdili, že genetická diverzita v dolní části toku u *Potamogeton coloratus* může být vyšší. Další studie zase poukázaly na vliv vzdálenosti populací od toku, kdy populace *Hibiscus moscheutos* vzdálenější od koryta (a bez častého přísunu diaspor) jsou méně rozmanité (Kudoh et Whigham, 1997). K předpovězení možné vnitropopulační diverzity druhu je vždy potřeba znát jeho ekologii a krajinu, ve které se vyskytuje. Fér (2008) zjistil závislost diverzity na způsobu šíření druhu – u převážně hydrochorních druhů dochází k výskytu vyšší diverzity v nižších částech toku (stejně jako Barrett et al., 1993), u anemochorních rostlin nenašel žádnou korelaci se směrem proudění.

Na prostorové rozložení genetické variability v rámci populace a mezi populacemi rostlin rostoucích na březích řek má velký vliv i způsob rozmnožování (Ellstrand et Roose, 1987; Widén et al., 1994; Honnay et Bossuyt, 2005). Generativní rozmnožování pomocí semen například zajišťuje vyšší genový tok mezi populacemi (Pollux et al., 2007). U vodních rostlin se ovšem častěji než jinde v rostlinné říši setkáváme s klonálním způsobem života (Les et al., 2003). Primární funkcí nepohlavního rozmnožování je zvýšení přežití genety (genetický jedinec x rameta – výběžek genety vypadající jako samostatný jedinec) v podmínkách, které znemožňují nebo omezují úspěch sexuálního rozmnožování (Grace, 1993, Sculthorpe, 1967). Tyto podmínky zahrnující sníženou úspěšnost semen, nevhodné ekologické podmínky pro jejich produkci, zrání, klíčení, uchycení, nepřítomnost sexuálního partnera, jsou v říčním prostředí velmi časté (Barrett et al., 1993).

Díky klonálnímu růstu a nízké investici do takto vyrobených propagulí se vodní rostliny mohou šířit bez velkých nákladů i na velké vzdálenosti (Grace, 1993), na základě plovatelnosti fragmentů (vysoké například u vzplývavých vodních rostlin) nebo při náhodných událostech typu povodní, kdy může dojít k utržení části (nebo i celé) ramety a našíření do vzdálených míst, kde dojde k přímému využití místních živin bez fáze klíčení a následnému založení populace. Není tedy náhodou, že klonální druhy jsou široce rozšířené, v některých případech i subkosmopolitní, a mají velký invazní potenciál (Santamaría, 2002; Thiébaud, 2007).

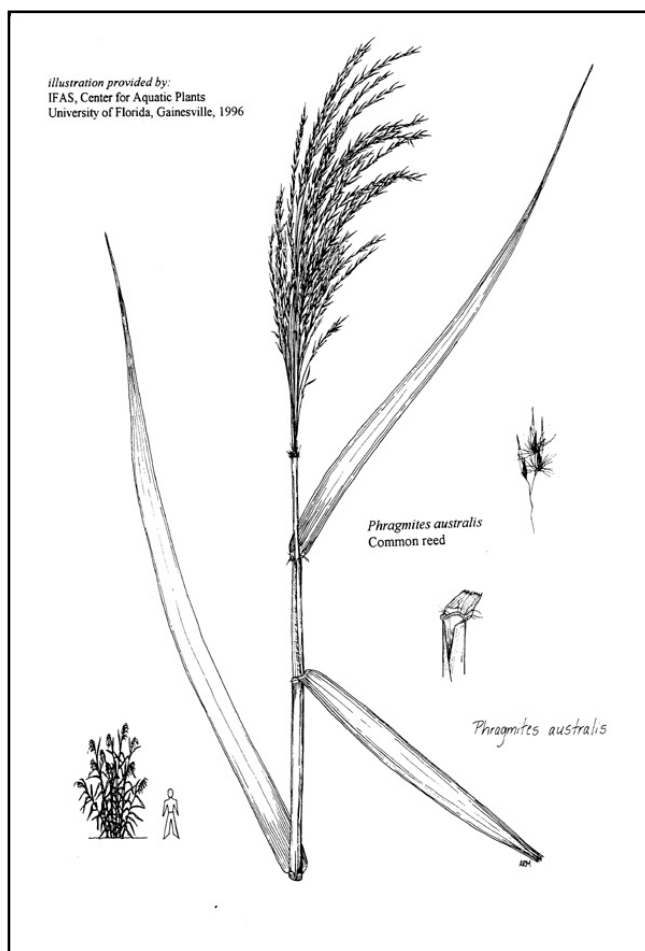
Přes jejich četnost však byly dlouhou dobu ekologické a evoluční studie těchto druhů silně omezeny kvůli problematickému stanovení počtu, velikostí a stáří genetických jedinců v populaci. V posledních letech došlo k velkému pokroku vývojem polymorfních markerů. Již jsme schopni odhalit identické jedince na základě genetické informace, ale stále chybí standardizovaný rámec pro posouzení klonality. Proto je velmi složité srovnávat jednotlivé studie používající různé metody. Tento problém nastínila ve svém review Arnaud-Haond (2007), která zkoumala výhody i nevýhody různých metod určování klonů a statistických analýz populačních dat. Většina studií zabývajících se klonálními rostlinami vyšla po roce 1995 díky rozvoji molekulárních metod, ovšem i tak došlo v řadě případů k nadhodnocení klonálního šíření – za identické byli označeni i jedinci nepocházející z jedné genety. Proto je vždy potřeba použít dostatečně variabilní marker, aby k takovýmto chybám nedocházelo, ovšem na druhé straně při přílišné variabilitě hrozí riziko somatických mutací. Mikrosatelity odpovídají požadavkům dostatečné variability (Ouburg et al., 1999) a pravděpodobnost náhodného výskytu dvou shodných genotypů aniž by se jednalo o klony lze testovat (Arnaud-Haond et al., 2007).

Při úspěšném určení klonů můžeme zkoumat míru klonality pro danou populaci a genetickou strukturu mezi populacemi. Některé druhy vytvářejí velké populace tvořené několika klony (Thiébaud, 2007; Ren et al., 2005), jiné tvoří polyklonální porosty pouze zřídka (Nies et Reusch, 2005). Bylo dokázáno, že u některých druhů závisí míra klonality i na prostředí, ve kterém se daná populace nachází (Pollux et al., 2007) a na stáří populace (Čurn et al., 2007; Křiváčková-Suchá et al., 2007). A ačkoliv je míra klonality velice variabilní v rámci druhu i lokality (Klekowski, 2003; Loxdale et Lushai, 2003), je její odhalení nezbytné pro všechny studie zabývající se šířením rostlin a genetickým tokem.

## 2.3 Rákos obecný

Rákos obecný (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud) je víceletá kosmopolitně rozšířená rostlina z čeledi Poaceae, která typicky tvoří rozsáhlé klonální porosty (Marks et al., 1993). Její původ je nejspíše ve východní či střední Asii (Gorenflot et al., 1990 ex Clevering et Lissner, 1999). Roste typicky v litorálu stojatých i pomaleji tekoucích vod a ve vlhkých prohlubních, ať už ve volné krajině nebo podél silnic a železničních tratí. Ekologické rozpětí druhu je široké - daří se mu na většině typů půd, od jílovitých po písčité, je tolerantní k slaným i alkalickým podmínkám (Marks et al., 1993),

dokáže růst od stanovišť chudých na živiny až po eutrofní vody (Casper and Krausch, 1980).



Obrázek 2.2: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.  
zdroj: <http://aquat1.ifas.ufl.edu/phraus2.jpg>

Jedná se o 2 až 4 m vysokou víceletou rostlinu se vzpřímenými stébly, která jsou neohebná, hladká a dutá, v průměru mohou mít až 2,5 cm a jsou zakončena hustou 30cm latou s 3-7květými klásky. 25 – 50 cm dlouhé šedozelené listy vyrůstají ze stébela, mohou být až 5 cm široké. Rostlina má velmi silně vyvinutý kořenový systém sahající do hloubky okolo 1 m, který vytváří hustou síť výběžků, z nichž vyrůstají ramety.

Rozmnožuje se vegetativně výběžky i generativně plody (Hejný, 1960). Obilky jsou šířeny především větrem a to na velké vzdálenosti. Pokud roste jedinec poblíž vodních toků, může docházet i k šíření vodou (Boedeltje et al., 2004). Do vody mohou padat celé laty a semena mohou plavat i několik dní (Morton et Hogg, 1989). Je známé i šíření ptáky (Ridley, 1930). Rozmnožování semen v přírodních podmínkách ovšem často nebývá úspěšné (Rodwald-Rudescu, 1974) – semena potřebují k úspěšnému vyklíčení otevřená místa bez vegetace, s vhodnými světelnými a vlhkostními podmínkami (Luther, 1951).

Takové lokality se v ekosystému nacházejí jen málokdy, například po disturbancích v krajině jako jsou povodně nebo při obnažení dna rybníku (Weisner et al., 1993). Vegetativní rozmnožování je naproti tomu velmi úspěšné, klonální růst slouží k rozšíření populace na dané lokalitě, přičemž tyto lokality nemusí být nutně složeny pouze z jednoho klonu (Haslam, 1972). Krom rozšiřování populace na místě může také dojít k ulomení



Obrázek 2.3: tři semenáčky: A-velmi mladý, C-nejstarší  
zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Warming-Skudbygning-Fig10-Phragmites-australis.jpg>

oddenku a jeho přenosu vodou na nové lokality a tím i k šíření jedince (Luther, 1951).

*Phragmites australis* je jedním z nejvíce studovaných vodních makrofyt (Fér, 2008). Jeho kosmopolitní rozšíření, vysoký počet ploidních úrovní a klonální charakter nabízí mnoho otázek ohledně morfologie (Haslam, 1969; 1970), ekologie (Björk, 1967; Haslam, 1970), ekofyziologie (Rychnovská, 1978; Armstrong et al., 1999) atd.

Byla dokázána souvislost mezi morfologickými znaky, ekologií a úrovní ploidie (Clevering et Lissner, 1997). Základními euploidními čísly tohoto druhu jsou 3x, 4x, 6x, 7x, 8x, 10x, 11x, 12x ( $x=12$ ). Nejběžnější jsou tetraploidi ( $2n = 48$ ) a oktoploidi ( $2n = 96$ ) (Clevering et Lissner, 1999). Tetraploidi jsou považováni za allotetraploidy vzniklé hybridizací dvou mateřských druhů, oktoploidi jsou naproti tomu autoallooktoploidní, tedy vznikli zdvojením chromosomů allotetraploidů (Clevering et Lissner, 1999). Díky migraci polyploidů, ke které docházelo několik tisíc let, můžeme dnes najít centra rozšíření jednotlivých stupňů ploidie. Evolučně zřejmě nejstarší tetraploidi jsou dominantní v Evropě a Americe, kdežto oktoploidi mají své centrum rozšíření v Asii (přičemž bylo dokázáno, že k jejich vzniku - tedy zdvojení chromosomů - došlo opakovaně; Gorenflot et al., 1979 ex Clevering et Lissner, 1999). V České republice se setkáváme s tetraploidy (Pazourková, 1973) (oktoploidní populace byla nalezena pouze na slanisku Nesyt; Clevering et Lissner, 1999).

Rákos je hojně studován i pro svůj klonální charakter. Byly nalezeny různé stupně klonální diverzity, od monoklonálních po polyklonální populace (Neuhaus et al., 1993; Koppitz et al., 1997). Každá populace nejspíše prodělává tři fáze. Fázi kolonizační, kdy na novém místě klíčí řada semen, postupně se rozrůstají a začínají kompetovat. Klonální diversita je stále vysoká i ve fázi šíření a ustalování populace. Ve stacionární fázi začínají převládat pouze klony nejlépe přizpůsobené danému prostředí (Koppitz et Kühl, 2000). Nízká klonální diverzita a monoklonální populace tedy mohou být následkem selekčního procesu a být důkazem lokality se stálými podmínkami (Watkinson et Powell, 1993). Výskyt nových klonů v takovéto populaci zprostředkovaných semeny je možný pouze v období „oken“ způsobených například disturbancemi (Eriksson, 1997; Clevering, 1999).

Nenáhodné prostorové rozložení genet v rámci ustálené populace bylo zjištěno například v deltě řeky Mississippi. Setkáváme se zde s klonem rostoucím uprostřed populace a klonem obklopujícím tyto kruhové ostrovy (White et al., 2004). Zároveň byly nalezeny i morfologické rozdíly mezi klony, a to nejen v této práci (White et al., 2004; Hansen et al., 2006). Rozložení jednotlivých klonů bylo prokázáno i v závislosti na gradientu hloubky vody (Engloner, 2011).

Přestože jsou v Evropě populace rákosu relativně stálé, představuje problematický druh například v severní Americe (Keller, 2000). Zde je tento druh považován za invazní a ohrožuje zdejší mokřadní ekosystémy (Marks et al., 1993). Nejedná se ale o klasickou invazi, bylo zjištěno, že některé populace jsou benigní a nepředstavují hrozbu, problematické ovšem je jednotlivé typy odlišit. Saltonstall (2002) porovnávala vzorky moderních společenstev s herbářovými položkami z období před rokem 1910. Díky molekulárním markerům odhalila tzv. kryptickou invazi – za dramatický nárůst počtu populací *Phragmites australis* může nepůvodní klon, který byl do oblastí zavlečen nejspíše člověkem, při převozu kamení a sutě z příbřežních oblastí do vnitrozemí na stavbu železnic a silnic koncem 19. století. Jedním z faktorů odpovědných za úspěšnost invaze druhu v Americe je i alelopatie (Callaway et al., 1999), tedy vylučování chemických látek do půdy, které narušují kořenové systémy okolních rostlin a zabraňují úspěšnému vyklíčení semen.

Relativně málo je ale známo o převládajícím způsobu reprodukce a dispersních strategiích v rámci populací i mezi populacemi. Přitom je to jeden z nedůležitějších ukazatelů prostorového rozložení genetické variability (Ouburg et al., 1999). Touto otázkou se zabýval Fér (2008). Objasnil roli řeky jako koridoru pro šíření rákosu. Některé skupiny jedinců (získaných na základě Bayesovského clusterování) se šířily náhodně mezi

řekami – tedy anemochorně nebo zoochorně. Jiné byly striktně vázány na koryto řeky, tedy byly šířeny vodou (nebo větrem) pouze v tomto koridoru. Vzdálenost mezi populacemi se stejným genotypem, a tedy i vzdálenost dálkového vegetativního šíření úlomky genet, se pohybovala mezi 0,5 až 10,8 km.

V krajině, kde není považován za invazní rostlinu, hraje rákos důležitou roli – chrání břehy vodních ploch před erozí půdy, udržuje živiny na daném místě, vytváří postupný přechod mezi vodní plochou a půdou. Slouží jako zdroj potravy pro členovce, ptáky a savce, vytváří specifický ekosystém, který slouží jako domov pro řadu ohrožených druhů, které jsou na tomto habitatu závislé (Ostendorp, 2003). Dříve býval často vysazován do nově vzniklých břehů, aby bránil jejich sesuvu (Uchýtil, 1992), tuto tendenci ovšem nemohu z vlastní zkušenosti potvrdit – v rámci budování nových břehů dochází spíše k úbytku rákosin. V dnešní době dochází k jeho přirozenému šíření spíše podél silnic a dálnic, kde nachází vhodné prostředí k růstu, díky síti lineárních mokřin - příkopům podél cest. Tyto dálniční koridory tvoří ideální prostředí pro invazi do nových prostor, odkud dochází i k šíření do mokřin vzdálenějších od silnic (Jodoin et al., 2008).

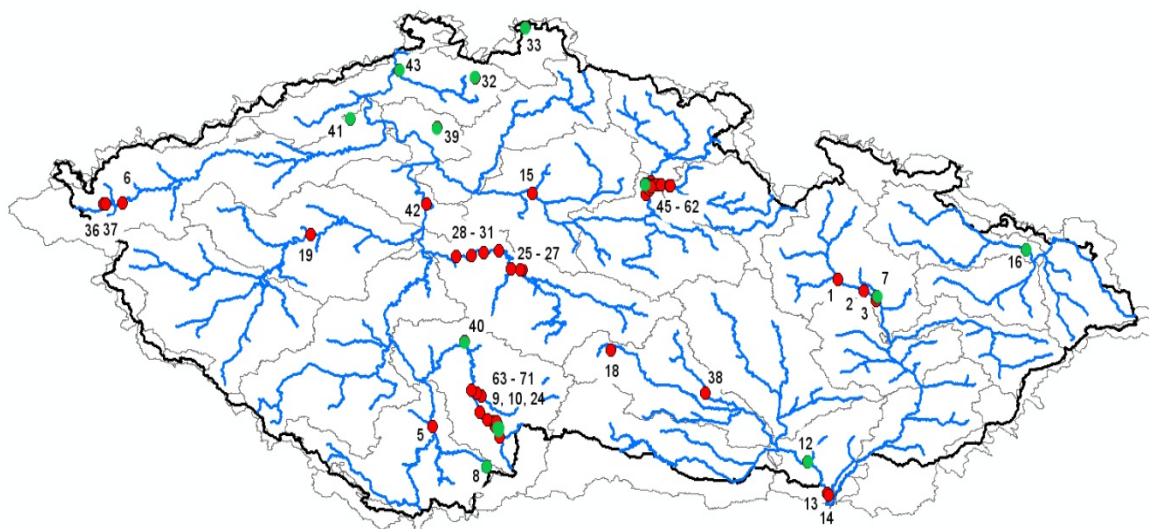


## Kapitola 3

### Metodika

#### 3.1 Sběr vzorků v terénu

V průběhu let 2007 – 2011 bylo odebráno 575 vzorků z 60 populací v rámci České republiky – 44 říčních a 16 rybníčních (obr. 3.1, tab. 3.1). Populace byla definována jako souvislý porost oddělený od případných dalších rákosových porostů minimálně čtyřiceti metry. V každé populaci byl proveden sběr vzorků na transektu (u řek souběžném s proudnicí) vedeném přibližným středem populace. Bylo odebráno 4 - 16 vzorků (většinou 10) v závislosti na velikosti populace, vzdálenost jednotlivých odběrů byla 2 – 10 m, bylo dbáno, aby sběr pokryl celou populaci a rozestupy byly stejné. Sbírány byly mladé nenapadené listy, jejichž část (3x5 cm) byla uchována v označených igelitových sáčkách se silikagelem (ten vzorky vysušil). U každé populace byla zaznamenána poloha pomocí GPS souřadnic, zda se jedná o rybníční nebo říční populaci, velikost populace (délka vzhledem ke břehu) (tab. 3.1).



Obrázek 3.1: Mapa posbíraných populací rákosu obecného. Zelené body značí populace z rybníků, červené populace z řek. Jsou zobrazeny hlavní toky (modrá čára) a povodí (šedá čára). Celkem bylo v ČR sebráno 575 vzorků z 60 populací. Podrobnější rozkreslení oblasti u Hradce Králové, Sázavy a Lužnice je v dodatku A.2. A.3 a A.4 na str. 92.

Tabulka 3.1: Přehled lokalit rákosu obecného. Viz též mapa na obr. 3.1. V prvním sloupci je číslo populaci, ve druhém řeka nebo povodí, ze kterého populace pochází, ve třetím lokalita. Dále následují souřadnice (ve formátu stupeň, minuta, vteřina, nejprve severní šířka, poté východní délka), počet sebraných vzorků z populace a přibližná velikost populace v metrech.

| pop | řeka<br>povodí        | lokalita                       | N             | E             | počet | velikost<br>[m] |
|-----|-----------------------|--------------------------------|---------------|---------------|-------|-----------------|
| 1   | Morava                | Moravičany                     | 49°44'20,58"  | 16°59'25,98"  | 13    | 20              |
| 2   | Morava                | Střeň                          | 49°40'58,8"   | 17°9'18,6"    | 8     | 5               |
| 3   | Morava                | Chomoutov                      | 49°37'59,1"   | 17°13'52,92"  | 12    | 15              |
| 5   | Vltava                | České Budějovice               | 49°0'28,7"    | 14°27'45,4"   | 10    | 30              |
| 6   | Ohře                  | Kynšperk nad Ohří              | 50°7'8,976"   | 12°31'17,076" | 9     | 15              |
| 7   | Morava                | Chomoutovské jezero            | 49°39'3,539"  | 17°14'4,109"  | 10    | 50              |
| 8   | Stropnice<br>(Vltava) | Lomský rybník                  | 48°48'28,188" | 14°47'58,4"   | 10    | 80              |
| 9   | Lužnice               | rybník Nový vdovec<br>(Třeboň) | 49°1'52,464"  | 14°50'30,23"  | 10    | 60              |
| 10  | Lužnice               | rybník Vítek (Třeboň)          | 49°2'13"      | 14°48'13,464" | 10    | 50              |
| 12  | Dyje                  | Květné jezero (Dyje)           | 48°49'41,4"   | 16°48'2,412"  | 10    | 40              |
| 13  | Dyje                  | Hraniční cesta (Dyje)          | 48°40'24,6"   | 16°55'31,62"  | 10    | 15              |
| 14  | Kyjovka<br>(Dyje)     | most přes Kyjovku              | 48°39'47,772" | 16°55'58,332" | 10    | 20              |
| 15  | Labe                  | mezi Nymburkem a<br>Poděbrady  | 50°10'7"      | 15°4'56"      | 9     | 15              |
| 16  | Opava                 | Křivý rybník                   | 49°53'12"     | 18°10'11"     | 10    | 30              |
| 18  | Jihlava               | Jihlava                        | 49°23'10,5"   | 15°34'30,66"  | 8     | 30              |
| 19  | Berounka              | Zvíkovec                       | 49°57'40,788" | 13°41'58,452" | 7     | 10              |
| 24  | Lužnice               | Černiční rybník                | 49°4'37,764"  | 14°45'21,5"   | 16    | 400             |
| 25  | Sázava                | Kácov                          | 49°47'7,337"  | 15°1'23,017"  | 4     | 10              |
| 26  | Sázava                | Kácov                          | 49°47'10,7"   | 15°0'31,4"    | 10    | 15              |
| 27  | Sázava                | Soběšín                        | 49°47'35,4"   | 14°57'1,8"    | 7     | 15              |
| 28  | Sázava                | Pyskočely                      | 49°52'47,7"   | 14°52'30,2"   | 9     | 15              |
| 29  | Sázava                | Hvězdonice                     | 49°52'26,2"   | 14°46'36,9"   | 9     | 15              |
| 30  | Sázava                | Čerčany                        | 49°51'30,2"   | 14°42'6,8"    | 5     | 10              |
| 31  | Sázava                | Zbořený Kostelec               | 49°51'8,5"    | 14°36'32,2"   | 8     | 15              |
| 32  | Ploučnice             | Velký Valtínov Hrubý<br>rybník | 50°44'34,376" | 14°43'31,6"   | 58    | 100             |
| 33  | Nisa                  | Černousy Dubový<br>rybník      | 50°59'42,66"  | 15°2'22,8"    | 35    | 150             |
| 36  | Ohře                  | Tršnice                        | 50°6'54,9"    | 12°24'10,1"   | 8     | 80              |
| 37  | Ohře                  | Doubí                          | 50°6'51,4"    | 12°25'4,5"    | 9     | 90              |
| 38  | Oslava                | Náměstí nad Oslavou            | 49°10'25,855" | 16°9'43,468"  | 4     | 5               |
| 39  | Labe                  | Medonosy                       | 50°29'42,835" | 14°29'19,802" | 4     | 80              |
| 40  | Lužnice               | Tábor - rybník Jordán          | 49°25'47,826" | 14°39'45,218" | 10    | 200             |
| 41  | Labe                  | Milešov - rybník Luční<br>mlýn | 50°32'18,645" | 13°56'53,383" | 9     | 20              |
| 42  | Vltava                | Praha - Trója                  | 50°6'50,718"  | 14°25'16,85"  | 6     | 5               |
| 43  | Labe                  | Děčín - Folknáře               | 50°46'50,521" | 14°15'2,583"  | 5     | 30              |

|    |              |  |               |               |    |     |
|----|--------------|--|---------------|---------------|----|-----|
| 45 | Labe         | PCE - Opatovický rybník                      | 50°9'45,376"  | 15°47'29,772" | 11 | 15  |
| 46 | Labe         | HK - Malá Borovinka                          | 50°11'39,296" | 15°48'5,649"  | 11 | 50  |
| 48 | Labe         | HK - rybník u zahrádkářské kolonie           | 50°13'0,527"  | 15°47'23,816" | 12 | 200 |
| 49 | Labe         | HK - u železničního mostu (sever)            | 50°13'19,929" | 15°49'33,179" | 10 | 31  |
| 50 | Labský kanál | HK - Labský kanál                            | 50°12'38,473" | 15°47'57,609" | 4  | 15  |
| 51 | Orlice       | HK - Malšovice - u mostu                     | 50°12'37,371" | 15°51'22,332" | 5  | 15  |
| 52 | Orlice       | HK - Malšovice - slepé rameno                | 50°12'29,682" | 15°50'57,978" | 11 | 30  |
| 53 | Orlice       | HK - Malšovice - u elektrárny (slepé rameno) | 50°12'36,613" | 15°51'41,642" | 9  | 20  |
| 54 | Labe         | HK - Malšovice - u elektrárny                | 50°12'39,728" | 15°51'27,622" | 11 | 30  |
| 55 | Labe         | HK - soutok - u mostu                        | 50°12'6,204"  | 15°49'24,087" | 4  | 5   |
| 56 | Labe         | HK - Pražské předměstí                       | 50°11'50,42"  | 15°49'3,438"  | 10 | 25  |
| 57 | Labe         | HK - u Starého Labe                          | 50°11'17,943" | 15°48'59,051" | 11 | 20  |
| 58 | Orlice       | Malšova Lhota                                | 50°12'38,219" | 15°53'9,461"  | 7  | 15  |
| 59 | Orlice       | Blešno                                       | 50°12'25,059" | 15°56'20,929" | 14 | 60  |
| 60 | Orlice       | Blešno                                       | 50°12'14,015" | 15°56'41,295" | 10 | 50  |
| 61 | Labe         | soutok                                       | 50°12'17,59"  | 15°49'25,696" | 4  | 5   |
| 62 | Labe         | soutok                                       | 50°12'4,735"  | 15°49'26,454" | 4  | 2   |
| 63 | Lužnice      | Majdalena                                    | 48°57'5,157"  | 14°52'39,82"  | 4  | 2   |
| 64 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°0'17,028"  | 14°51'10,551" | 12 | 30  |
| 65 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°0'37,541"  | 14°51'48,692" | 5  | 10  |
| 66 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'5,13"    | 14°51'46,253" | 5  | 10  |
| 67 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'19,114"  | 14°51'41,291" | 5  | 10  |
| 68 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'51,628"  | 14°51'42,185" | 4  | 8   |
| 69 | Lužnice      | Hamr   | 49°9'24,578"  | 14°45'59,651" | 5  | 5   |
| 70 | Lužnice      | Krkavec                                      | 49°10'18,626" | 14°44'13,902" | 10 | 30  |
| 71 | Lužnice      | Veselí n. Luž.                               | 49°11'19,198" | 14°42'7,102"  | 5  | 8   |

### 3.2 Laboratorní zpracování vzorků

Z každé populace byly vybrány 2-4 vzorky k analýze v laboratoři DNA Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (<http://botany.natur.cuni.cz/dna>), a to s důrazem na pokrytí prostorové variability celé populace (tedy vzorky ze začátku populace, z druhé čtvrtiny populace, třetí čtvrtiny populace a z konce populace, v případě malých populací byl snížen počet analyzovaných vzorků). Kompletní protokoly jsou v dodatku B str. 97. DNA z vysušených listových čepelí byla extrahována metodou CTAB (Doyle et Doyle, 1987) a rozpuštěna v 1xTE pufru. Poté byla změřena koncentrace získané DNA na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf) a DNA byla naředěna dvakrát destilovanou vodou (ddH<sub>2</sub>O) na koncentraci 5 ng.μl<sup>-1</sup> (dodatek B.1 str. 97).

Takto naředěná DNA byla použita k polymerase chain reaction (PCR). Mikrosatelitová analýza byla provedena s využitím PCR o objemu 10 μl směsi s 10 páry fluorescenčně značených primerů (tab. 3.2; Saltonstall, 2003). Složení směsi pro PCR reakci: sterilní voda 6,92 μl, Mg<sup>2+</sup> 0,5 μl, pufr pro RED Taq (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 μl, dNTP 0,2 μl, reverse primer 0,13 μl, forward primer 0,13 μl (fluorescenčně značený), Red Taq polymeráza (Sigma, koncentrace 1 jednotka/ μl) 0,25 μl, DNA 1 μl. Koncentrace primerů byla 25 ng.μl<sup>-1</sup>. V případě neúspěšné PCR byla reakční směs upravována zvýšením množství DNA, primerů a enzymu ve směsi (viz dodatek B.2 str. 98).

Lokusy byly amplifikovány v termocykleru Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) s následujícím programem: 94 °C 2 minuty; 35x 94 °C 30 sekund, 50 °C 30 sekund, 72 °C 40 sekund; 72 °C 15 minut; 10 °C do otevření víka (viz dodatek B.2 tsb. B.2 str. 97). PCR byla prováděna pro každý primer zvlášť. Následně byly alely pro kontrolu vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy na 1% agarosovém gelu v TAE bufferu s použitím ethidium bromidu ke zviditelnění DNA v UV světle kamerou Kodak Gel Logic 100. Pokud byly proužky viditelné v odpovídajícím rozsahu délek alel, byly PCR fragmenty přesráženy se standardem GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; postup viz dodatek B.3.1 a B.3.2 str. 100). Vzhledem k možnému použití 3 barev (+ jedna pro standart) bylo možné nakombinovat jednotlivé primery do 2 multiplexů (Mastermix 1: PaGT4, PaGT8, PaGT9, PaGT14, PaGT16; Mastermix 2: PaGT11, PaGT12, PaGT13, PaGT21, PaGT22). Dva multiplexy pro každý vzorek byly vizualizovány na automatickém sekvenátoru ABI 3100 Avant Genetic Analyzer v sekvenční laboratoři biologické sekce PřF UK (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab/>).

Tabulka 3.2: přehled selektivních jaderných primerů pro rod *Phragmites australis* (Saltonstall 2003), první řádek označuje jednu ze 3 fluorescenčních barev (čtvrtá byla použita pro standart), následuje název příslušného lokusu, opakující se tandemová repetice DNA, sekvence selektivních primerů (forward a reverse) a na závěr délkový rozsah jednotlivých alel podle práce Saltonstall (2003) a rozdělení do dvou multiplexů podle barev a délek alel.

| barva          | HEX                          | NED                           | 6-FAM                        | HEX                          | NED                           | 6-FAM                        | HEX                         | NED                          | 6-FAM   | HEX                                    |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---|--|
| lokus          | PaGT4                        | PaGT8                         | PaGT9                        | PaGT11                       | PaGT12                        | PaGT13                       | PaGT14                      | PaGT16                       | PaGT21  | PaGT22                                 |
| repeat units   | (CA) <sup>9</sup>            | (CA) <sup>8</sup>             | (CA) <sup>10</sup>           | (CA) <sup>8</sup>            | (CA) <sup>9</sup>             | (CA) <sup>9</sup>            | (CA) <sup>7</sup>           | (CA) <sup>10</sup>           | (CA) <sup>5</sup> (AT) <sup>6</sup> (CA) <sup>6</sup> | (AC) <sup>8</sup> CTT(GA) <sup>5</sup> |
| forward primer | TGCTCCC<br>TGCAGTT<br>TCTTG  | TCTGAAC<br>ATAATCC<br>TGGTGG  | CCATGTG<br>TTAATGTT<br>GTCC  | CAACTCC<br>GTGAATG<br>ACATGC | CTTCCTA<br>GGTCAGT<br>ATCATCC | CTCATGC<br>ATCACTT<br>CACAGG | GTTGCAG<br>CAAGTAT<br>TTGG  | ACCAATC<br>AGTCAGA<br>CTAGCC | GCTACTCA<br>ACAGGTAT<br>ACGG                          | TTGAGTG<br>CCTGGTG<br>TATTCCG          |
| reverse primer | TATCCAC<br>CCTTCGA<br>AGGCAC | TCTTGTG<br>TGAAGCA<br>GTTCTGC | ATTGAAT<br>CCACACG<br>TTTCCG | CAGTTTG<br>TGCACTA<br>ATGGAC | GTGGCAG<br>CTGATTG<br>ATTGG   | ACACGGA<br>CCTAACA<br>TCAACC | CAAGCAT<br>TCTAGTA<br>GTAGC | GTTCTCA<br>TGTTGGA<br>GAAGCC | ATTGAGG<br>ATTGAGGT<br>GGTGG                          | AAGCTTC<br>TGTCATG<br>GAACCG           |
| velikost       | 266-284                      | 170-193                       | 188-224                      | 142-151                      | 151-196                       | 206-224                      | 169-198                     | 231-298                      | 138-199   | 159-209                                |
| multiplex      | M I                          | M I                           | M I                          | M II                         | M II                          | M II                         | M I                         | M I                          | M II  | M II                                   |

### 3.3 Vyhodnocení primárních dat

Primární data získaná z automatického sekvenátoru byla analyzována pomocí demo verze programu GeneMarker (SoftGenetics, LLC., State College, PA, USA, <http://www.softgenetics.com/genemarker.html>) a údaje o velikosti jednotlivých alel byly zaznamenány do tabulky (viz dodatek D.1 str. 106). Tato tabulka sloužila jako zdroj pro datové matice k jednotlivým programům. Tyto matice byly vytvářeny dvěma postupy pro zpracování dat allotetraploidních jedinců. Podle Becher et al. (2000) byla skórována každá zjištěná alela jako přítomná či nepřítomná v daném vzorku, výsledkem byla binární matice. Podle Saltonstall (2003) se v případě výskytu pouze 3 alel v lokusu zbývající označila za chybějící, v případě výskytu pouze jedné nebo dvou alel se zbývající doplnily jako jejich kopie. Pro potřeby analýz a odpovědi na jednotlivé otázky byly vytvářeny i soubory dat z jednotlivých povodí, geografických oblastí nebo na základě původu populací - rybník x řeka (viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90). Byly spočítány počty a frekvence jednotlivých alel pro lokusy i jednotlivé populace.

Vzhledem k problematickému vyhodnocování dat polyploidních druhů bylo nutné zvolit vhodný postup pro tvorby datových matic a následně z nich pro některé analýzy vyřadit jedince se shodným genotypem. Bohužel pro takto velký soubor dat nebylo možné využít programu Tetrasat (Markwith et al., 2006), který by počítal se všemi možnostmi chybějících alel. U obou použitých skórovacích postupů (podle Saltonstall, 2003; Becher et al., 2000) tedy došlo ke ztrátě variability a při čtení primárních dat z programu GeneMarker (SoftGenetics, LLC., State College, PA, USA) mohlo také dojít k chybnému

určení některých sporných alel. Chyby ve skórování mohou být trojího typu (Schnittler et Eusemann, 2010): splývací chyba, kdy dojde ke splnutí geneticky podobných jedinců (Douhovnikoff et Dodd, 2003), štěpící chyba, kdy dojde k rozdělení klonu, a nemá chyba, kdy dojde k přeměně jednoho unikátního genotypu do jiného unikátního genotypu. První typ chyby vede ke zvýšení odhadu klonálního růstu, druhá ke snížení a třetí chyba na odhad nemá vliv. Tyto chyby byly do jisté míry eliminovány díky analýze programu AFLPdat (Ehrich, 2006), který při zařazení všech vzorků do jedné populace vykreslil histogram počtu dvojic lišících se o daný počet alel. Většina dvojic má Gaussovo rozdělení, dvojice lišící se o malý počet alel nespádající do tohoto rozdělení mohou mít svůj původ právě v chybě skórování, proto jsou považovány za klony. Schnittler et Eusemann (2010) potvrdili zpřesnění odhadu míry klonality u matice, ve které byly za klony určeni jedinci lišící se o 0 nebo 1 alelu, oproti matici, kde nebyla chyba připuštěna.

Párová genetická vzdálenost Nei's gene diversity (Nei et al., 1983) mezi jedinci byla určena pomocí programu AFLPdat (Ehrich, 2006; <http://www.nhm.uio.no/ncb/>). Také seznam vzorků lišících se o  $x$  proužků byl vygenerován pomocí tohoto programu, a to jak v rámci všech vzorků, tak v rámci každé populace. Program AFLPdat pracoval s binárními daty podle Becher et al. (2000) a byly v něm vytvořeny vstupní matice do programů Arlequin (Excoffier et al., 2006) a Structure (Falush et al., 2007). Matice pro programy FAMd, BAPS 3.2 a Structure byly zbaveny klonů (a obsahovaly tedy pouze jednotlivé genety).

Analýza molekulární variance (AMOVA, Excoffier et al., 1992) zjišťující genetickou variabilitu v rámci populací, mezi populacemi a mezi skupinami populací (většími geografickými oblastmi) byla provedena pomocí programu Arlequin (Excoffier et al., 2006; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). AMOVA byla počítána jako  $F_{ST}$  (Weir et Cockerham, 1984) – na základě sdílených alel. Fixační index statistiky  $F_{ST}$  byl počítán na základě podílu shodných alel a všechny výpočty byly testovány 10 000 permutacemi. Zjišťovala se genetická variabilita v rámci populací a mezi populacemi pro datovou matici všech vzorků a datovou matici pouze rybníčních populací. Genetická variabilita mezi skupinami populací, mezi populacemi a v rámci populací se zjišťovala pro datovou matici říčních populací (kde byly řeky rozděleny podle jednotlivých povodí) a pro datovou matici vybraných geografických území (viz viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90).

Nezakořeněný fylogenetický strom pro znázornění příbuznosti byl vytvořen v programu FAMd (Schlütter et Harris, 2006) na základě spočítaných vzdáleností mezi

jedinci z binární matice podle Becher et al. (2000) metodou Neighbour joining. Tato metoda na začátku vytvoří jeden hvězdicový strom, kde je jeden vnitřní vrchol, a všechny taxonomické jednotky jsou reprezentovány pomocí listů. Tento strom se postupně rozkládá shlukováním nejbližších taxonomických jednotek tak, aby se v každém kroku co možná nejvíce zmenšila celková délka stromu. Na rozdíl od metody UPGMA (Underweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) zde nepředpokládáme konstantní substituční rychlosti a je zde garance nalezení správného stromu, pokud jsou správně vypočtené distance. Byl vytvořen strom pro všechny populace, pro říční populace a pro populace vybraných geografických oblastí (viz viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90.), všechny datové matice byly zbaveny klonů. Strom byl vizualizován a upraven v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Mnohorozměrná analýza hlavních koordinát PCoA (principal coordinate analysis) zobrazující shluky geneticky podobných jedinců byla provedena také v programu FAMD (Schlütter et Harris, 2006). Vstupními daty byly matice se všemi vzorky, matice s říčními lokalitami a matice pro vybrané geografické oblasti (viz viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90). Díky této analýze můžeme vidět, zda některá geograficky oddělená skupina tvoří samostatný shluk geneticky podobných jedinců.

Pro odhalení celkové genetické struktury vzorků bylo provedeno Bayesovské shlukování (Corander et Marttinen, 2007) v programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen, 2007), vstupní matice byla kódována podle Saltonstall (2003). Program hledá nejnížší počet shluků s nejvyšší pravděpodobností modelu. Maximální počty shluků byly stanoveny od 10 do 45, pro každý počet skupin byl výpočet pětikrát opakován.

Genetická struktura populací byla zjišťována i pomocí programu Structure (Falush et al., 2007), který tvoří shluky na základě minimalizace odchylky od Hardy-Weibergovy rovnováhy a minimalizace nerovnováhy v zastoupení jednotlivých alel (linkage disequilibrium; Falush et al., 2003). Výpočty byly prováděny na volně dostupném serveru (bioportál univerzity v Oslu, Norsko; Schalchian-Tabrizi et al., 2004; <http://www.bioportal.uio.no/>), bylo použito výchozí nastavení, burn-in řetězec měl 100 000 kroků a bylo provedeno celkem 1 000 000 kroků. Předem daný počet skupin byl 1-10, pro každý počet běžel výpočet 10x. Výstupy byly zpracovány pomocí statistického balíku R (R Development Core Team, 2008) a skriptu Structure-sum-2009.R (Ehrich et al., 2007), díky kterému byly vypočteny koeficienty podobnosti mezi jednotlivými běhy algoritmu Structure (Nordborg et al., 2005) a byl určen nejlepší počet genetických skupin (Evano et al., 2005).

Dále byla z výsledků Structure připravena data pro tvorbu grafického výstupu v programu Distruct (Rosenberg, 2004).

Zjištění míry korelace mezi prostorovými a genetickými vzdálenostmi bylo spočítáno na základě kinship autokorelačního koeficientu pro dominantní markery (Hardy 2003) pomocí programu SPAGeDi (Hardy et Vekemans, 2002). Byla použita binární matice podle Becher et al. (2000) všech vzorků a binární matice pro vybrané geografické oblasti. Geografické vzdálenosti byly vypočteny jako přímé vzdálenosti pomocí programu Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3 ([http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg/](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/)). Pro matici se všemi populacemi byly použity vzdálenostní třídy 0,8 km, 4,5 km, 10 km, 20 km, 45 km, 65 km, 100 km, 165 km, 250 km 350 km a 400 km. Pro matice s populacemi z Labe a Orlice u Hradce Králové a s populacemi z Lužnice byly použity vzdálenostní třídy 0,5 km, 1 km, 1,5 km, 2 km, 3 km, 5 km, 7,5 km, 10 km, 15 km, 20 km, 30 km a 45 km. Matice z povodí Moravy a Sázavy obsahovaly méně jedinců a proto bylo třeba vzdálenostní třídy upravit (pro Moravu 3 km, 7,5 km, 10 km, 15 km a 25 km, pro Sázavu 1 km, 2,5 km, 5 km, 7,5 km, 12,5 km, 20 km, 30 km, 40 km, 52,5 km a 65 km). Standardní chyby koeficientů vzdálenosti byly odhadnuty procedurou jackknife (15 000 opakování), výpočty byly testovány 15 000 permutacemi.



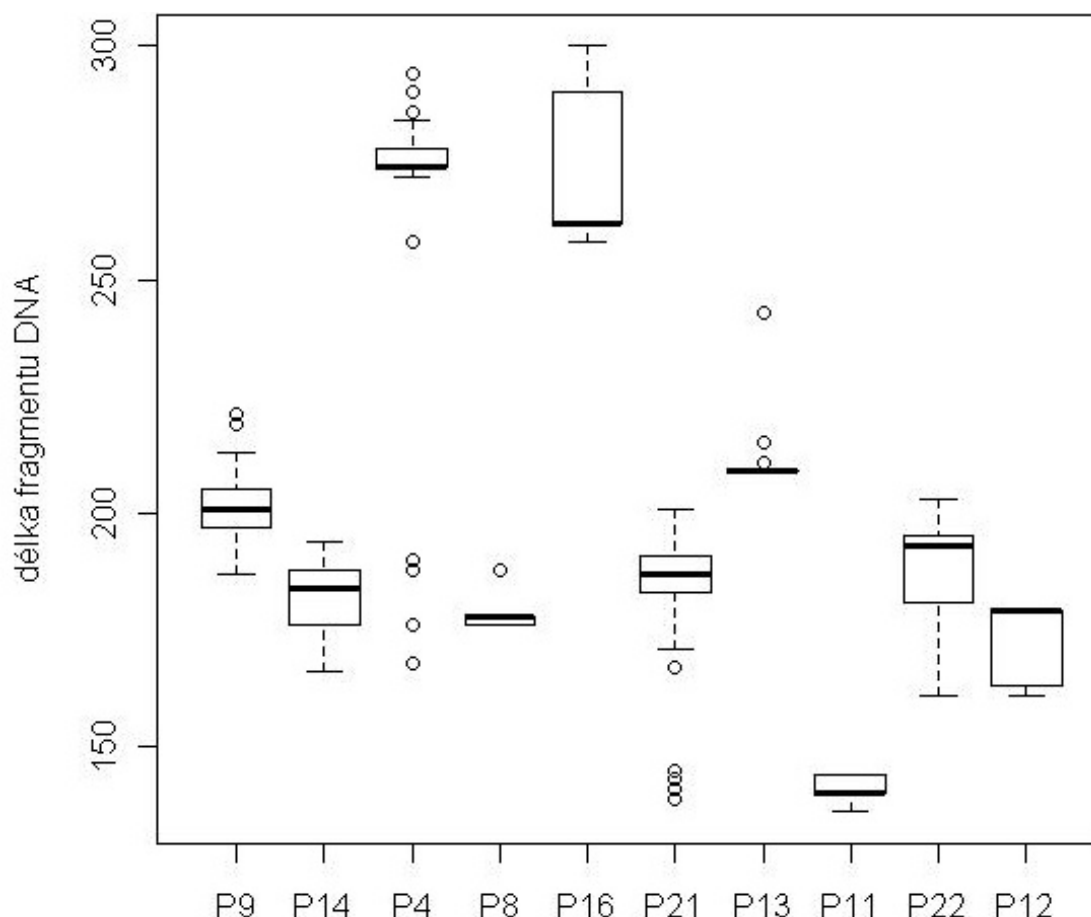
## Kapitola 4

### Výsledky

Bylo analyzováno celkem 202 jedinců z celkových 575 sebraných vzorků rákosu obecného (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud) z 60 populací. Vzorky pocházely ze 44 říčních populací a 16 populací rybníků. Tímto sběrem byly odebrány vzorky z 11 řek – Berounky, Dyje, Jihlavy, Labe, Lužnice, Moravy, Ohře, Orlice, Oslavy, Sázavy a Vltavy. Vzorky byly analyzovány technikou mikrosatelitových jaderných primerů a dále zpracovány matematickými metodami.

V průběhu laboratorního zpracování vzorků se mi podařilo úpravou PCR směsi amplifikovat alely ve všech lokusech. Proto jsou chybějící data pouze v případě skórování podle Saltonstall (2003) pro analýzy v programu BAPS (Corander et Marttinen, 2007).

Na obrázku 4.1 je zobrazen krabicový graf ukazující délkové rozpětí alel u jednotlivých lokusů, jejich seznam, délkové rozpětí alel v lokusu a počet nalezených alel pro lokus je shrnuto v tab. 4.1. V tabulce 4.2 jsou jednotlivé alely rozepsány, je u nich uveden součet výskytů v celé datové matici a procentuelní zastoupení jednotlivých alel. Ve většině lokusů můžeme najít malé množství vzácných alel, které se vyskytují jen u několika populací, a také o něco větší množství četných alel. Některé vzácné alely se vyskytovaly jen v určité populaci, například PaGT9-219 pro populaci 10, PaGT9-221 pro 40, PaGT14-178 pro 41, PaGT8-188 pro 27 a 28, PaGT16-292 pro 8, PaGT21-143 pro 13, 171 pro 33, PaGT21-195 pro 36 a 37, PaGT13-243 pro 32, PaGT22-175 pro 26. Jako alela specifická pro geografické území by se dala značit PaGT21-195, která byla nalezena u všech vzorků populací 36 a 37, lokalita Ohře, ale neobsahuje ji populace 6 (také z Ohře). Nejvíce unikátních alel bylo nalezeno v populaci 33 (rybník, severní Čechy).



Obrázek 4.1: Přehled délkového rozsahu jednotlivých lokusů mikrosatelitových alel rákosu obecného pro všechny populace. Vodorovná osa znázorňuje jednotlivé lokusy, svislá délky fragmentů DNA. V každém lokusu je několik alel četných a několik alel vzácných. Podrobný přehled rozsahů jednotlivých lokusů a počtu alel viz. tab. 4.1, frekvence jednotlivých alel v celém datovém souboru viz. tab. 4.2.

Tabulka 4.1: Seznam analyzovaných mikrosatelitových lokusů (první sloupec), nalezený délkový rozsah jejich alel (druhý sloupec) a počet nalezených alel o různých délkách (třetí sloupec). Některé lokusy (PaGT8, PaGT13, PaGT11, PaGT12) vykazují nízký počet nalezených alel, ze kterého má jedna či více alel vysokou frekvenci výskytu (viz tab. 4.2).

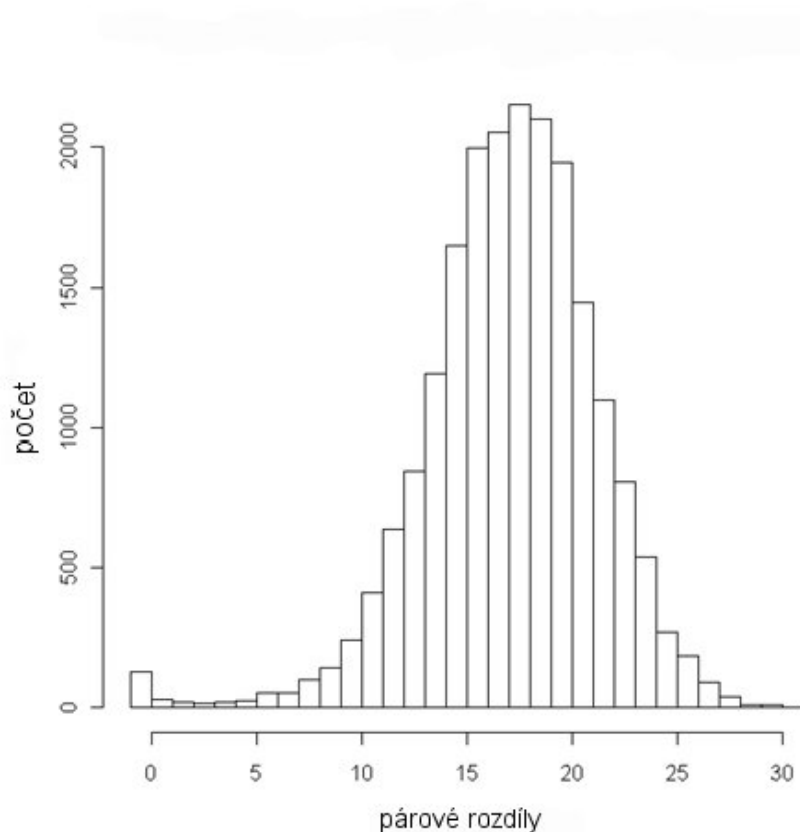
| lokus  | rozsah    | počet nalezených alel |
|--------|-----------|-----------------------|
| PaGT9  | 187 - 221 | 12                    |
| PaGT14 | 166 - 194 | 12                    |
| PaGT4  | 258 - 294 | 10                    |
| PaGT8  | 176 - 188 | 3                     |
| PaGT16 | 258 - 300 | 8                     |
| PaGT21 | 139 - 201 | 17                    |
| PaGT13 | 209 - 243 | 4                     |
| PaGT11 | 136 - 144 | 4                     |
| PaGT22 | 161 - 203 | 14                    |
| PaGT12 | 161 - 179 | 4                     |

Tabulka 4.2: Seznam jednotlivých délek alel pro všechny lokusy (1. a 4. sloupec; formát názvu jméno lokusu-délka alely), součtu výskytů v celém datovém souboru (2. a 5. sloupec) a zastoupení jednotlivých alel v celém souboru v procentech (3. a 6. sloupec). Některé alely se nacházely téměř ve všech vzorcích (např. PaGT4-274, PaGT8-176, PaGT8-178, PaGT13-209, PaGT11-140, PaGT11-144, PaGT12-179), jiné byly naopak vzácné (např. PaGT9-189, PaGT9-219, PaGT14-178, PaGT4-258, PaGT4-272, PaGT4-286, PaGT4-294, PaGT16-272, PaGT16-282, PaGT21-171, PaGT21-201, PaGT13-215, PaGT11-136, PaGT11-138, PaGT22-185, PaGT22-191). V každém lokusu se nachází jak četné alely, tak alely vzácné. PaGT22-161

| alela      | počet | procent | alela      | počet | procent | alela      | počet | procent |
|------------|-------|---------|------------|-------|---------|------------|-------|---------|
| PaGT9-187  | 78    | 38,6    | PaGT4-284  | 26    | 12,9    | PaGT21-199 | 24    | 11,9    |
| PaGT9-189  | 2     | 1       | PaGT4-286  | 3     | 1,5     | PaGT21-201 | 1     | 0,5     |
| PaGT9-197  | 73    | 36,1    | PaGT4-290  | 16    | 7,9     | PaGT13-209 | 200   | 99      |
| PaGT9-199  | 8     | 4       | PaGT4-294  | 1     | 0,5     | PaGT13-211 | 15    | 7,4     |
| PaGT9-201  | 57    | 28,2    | PaGT8-176  | 146   | 72,3    | PaGT13-215 | 1     | 0,5     |
| PaGT9-203  | 22    | 10,9    | PaGT8-178  | 158   | 78,2    | PaGT13-243 | 4     | 2       |
| PaGT9-205  | 83    | 41,1    | PaGT8-188  | 5     | 2,5     | PaGT11-136 | 1     | 0,5     |
| PaGT9-207  | 16    | 7,9     | PaGT16-258 | 72    | 35,6    | PaGT11-138 | 1     | 0,5     |
| PaGT9-209  | 6     | 3       | PaGT16-262 | 97    | 48      | PaGT11-140 | 202   | 100     |
| PaGT9-213  | 9     | 4,5     | PaGT16-272 | 1     | 0,5     | PaGT11-144 | 196   | 97      |
| PaGT9-219  | 2     | 1       | PaGT16-280 | 8     | 4       | PaGT22-161 | 1     | 0,5     |
| PaGT9-221  | 4     | 2       | PaGT16-282 | 1     | 0,5     | PaGT22-167 | 26    | 12,9    |
| PaGT14-166 | 6     | 3       | PaGT16-290 | 136   | 67,3    | PaGT22-175 | 4     | 2       |
| PaGT14-168 | 130   | 64,4    | PaGT16-292 | 4     | 2       | PaGT22-177 | 39    | 19,3    |
| PaGT14-176 | 134   | 66,3    | PaGT16-300 | 4     | 2       | PaGT22-179 | 5     | 2,5     |
| PaGT14-178 | 2     | 1       | PaGT21-139 | 28    | 13,9    | PaGT22-181 | 34    | 16,8    |
| PaGT14-180 | 12    | 5,9     | PaGT21-141 | 15    | 7,4     | PaGT22-183 | 52    | 25,7    |
| PaGT14-182 | 13    | 6,4     | PaGT21-143 | 4     | 2       | PaGT22-185 | 1     | 0,5     |
| PaGT14-184 | 61    | 30,2    | PaGT21-145 | 8     | 4       | PaGT22-189 | 9     | 4,5     |
| PaGT14-186 | 23    | 11,4    | PaGT21-167 | 22    | 10,9    | PaGT22-191 | 2     | 1       |
| PaGT14-188 | 119   | 58,9    | PaGT21-171 | 2     | 1       | PaGT22-193 | 78    | 38,6    |
| PaGT14-190 | 115   | 56,9    | PaGT21-173 | 21    | 10,4    | PaGT22-195 | 95    | 47      |
| PaGT14-192 | 15    | 7,4     | PaGT21-177 | 9     | 4,5     | PaGT22-197 | 23    | 11,4    |
| PaGT14-194 | 6     | 3       | PaGT21-183 | 75    | 37,1    | PaGT22-203 | 13    | 6,4     |
| PaGT4-258  | 2     | 1       | PaGT21-187 | 24    | 11,9    | PaGT12-161 | 87    | 43,1    |
| PaGT4-272  | 3     | 1,5     | PaGT21-189 | 38    | 18,8    | PaGT12-163 | 83    | 41,1    |
| PaGT4-274  | 154   | 76,2    | PaGT21-191 | 67    | 33,2    | PaGT12-165 | 15    | 7,4     |
| PaGT4-276  | 57    | 28,2    | PaGT21-193 | 23    | 11,4    | PaGT12-179 | 196   | 97      |
| PaGT4-278  | 17    | 8,4     | PaGT21-195 | 8     | 4       |            |       |         |
| PaGT4-282  | 33    | 16,3    | PaGT21-197 | 19    | 9,4     |            |       |         |

## 4.1 Klonální struktura populací

Program AFLPdat vykreslil na základě matice, kde byly všechny vzorky zařazeny do jedné populace, histogram počtu dvojic lišících se o daný počet alel (obr. 4.2). Na základě tohoto histogramu, kde většina dvojic má Gaussovo rozdělení, pouze páry lišící se o nula, jednu a dvě alely sem nespádají, byly za klony považovány jedinci lišící se o maximálně dvě alely.



Obrázek 4.2: Histogram počtu párů (svislá osa) vzorků lišících se o daný počet alel (vodorovná osa). U většiny párových rozdílů můžeme vidět rozdělení dle Gaussovy křivky, pouze dvojice s nula, jednou a dvěma rozdílnými alelami sem nespádají.

Z celkového množství 202 vzorků bylo nalezeno 101 různých genotypů, z 60ti populací bylo označeno 32 populací za monoklonální (30 z řek, 2 z rybníků), viz tab. 4.3. Seznam identických genotypů (tedy lišících se o maximálně dvě alely) pro jednotlivé vzorky je v tab. 4.4, pokud se jednalo o jedince se shodným genotypem v rámci jedné populace, byli označeni za klon a do analýz některých programů byl zahrnut pouze jeden zástupce klonu. Byly nalezeny i shodné genotypy nepatřící jedincům z jedné populace – vzorky {25\_1, 25\_4, 42\_2, 42\_5}, {27\_3, 28\_2, 28\_4, 27\_5, 27\_7, 28\_2, 28\_4}, {51\_1, 54\_11} (viz tab. 4.4), tyto vzorky nebyly podrobeny vyřazování klonálních jedinců.

Tabulka 4.3: Seznam populací (1. a 5. sloupec) s šedivě odlišenými neříčnými populacemi, počet analyzovaných vzorků pro danou populaci (2. a 6. sloupec), počet genotypů odhalených v dané populaci (3. a 7. sloupec) s šedivě označenými monoklonálními populacemi a zjištěná genetická diverzita pro danou populaci (4. a 8. sloupec). Bylo nalezeno celkem 101 genotypů (suma 3. a 7. sloupce), z 60ti populací bylo 32 monoklonálních, přičemž 30 monoklonálních populací bylo z řek a 2 z rybníků.

| populace | počet vzorků | počet genotypů | genotypová diverzita | populace | počet vzorků | počet genotypů | genotypová diverzita |
|----------|--------------|----------------|----------------------|----------|--------------|----------------|----------------------|
| pop1     | 4            | 1              | 0                    | pop40    | 4            | 1              | 0                    |
| pop2     | 4            | 1              | 0                    | pop41    | 4            | 2              | 0,667                |
| pop3     | 4            | 3              | 0,833                | pop42    | 2            | 1              | 0                    |
| pop5     | 4            | 1              | 0                    | pop43    | 4            | 2              | 0,667                |
| pop6     | 4            | 2              | 0,5                  | pop45    | 2            | 2              | 1                    |
| pop7     | 4            | 3              | 0,833                | pop46    | 4            | 2              | 0,667                |
| pop8     | 4            | 1              | 0                    | pop48    | 4            | 3              | 0,833                |
| pop9     | 4            | 4              | 1                    | pop49    | 4            | 2              | 0,5                  |
| pop10    | 4            | 4              | 1                    | pop50    | 2            | 2              | 1                    |
| pop12    | 4            | 2              | 0,5                  | pop51    | 2            | 2              | 1                    |
| pop13    | 4            | 1              | 0                    | pop52    | 4            | 2              | 0,667                |
| pop14    | 4            | 3              | 0,833                | pop53    | 4            | 1              | 0                    |
| pop15    | 4            | 4              | 1                    | pop54    | 4            | 2              | 0,5                  |
| pop16    | 4            | 2              | 0,5                  | pop55    | 2            | 1              | 0                    |
| pop18    | 4            | 1              | 0                    | pop56    | 4            | 1              | 0                    |
| pop19    | 4            | 1              | 0                    | pop57    | 4            | 1              | 0                    |
| pop24    | 4            | 4              | 1                    | pop58    | 3            | 1              | 0                    |
| pop25    | 2            | 1              | 0                    | pop59    | 4            | 1              | 0                    |
| pop26    | 4            | 2              | 0,5                  | pop60    | 2            | 1              | 0                    |
| pop27    | 3            | 1              | 0                    | pop61    | 2            | 1              | 0                    |
| pop28    | 4            | 2              | 0,667                | pop62    | 2            | 1              | 0                    |
| pop29    | 4            | 2              | 0,667                | pop63    | 2            | 1              | 0                    |
| pop30    | 4            | 1              | 0                    | pop64    | 4            | 1              | 0                    |
| pop31    | 4            | 1              | 0                    | pop65    | 2            | 2              | 1                    |
| pop32    | 4            | 2              | 0,5                  | pop66    | 2            | 1              | 0                    |
| pop33    | 4            | 3              | 0,833                | pop67    | 2            | 1              | 0                    |
| pop36    | 4            | 1              | 0                    | pop68    | 2            | 1              | 0                    |
| pop37    | 4            | 1              | 0                    | pop69    | 2            | 1              | 0                    |
| pop38    | 2            | 2              | 1                    | pop70    | 4            | 1              | 0                    |
| pop39    | 2            | 2              | 1                    | pop71    | 2            | 1              | 0                    |

Tabulka 4.4: Seznam identických genotypů vytvořených v programu AFLPdat v rámci celého souboru dat. Sloupce s názvem “vzorek” a “identický genotyp” znázorňují identické jedince, kteří se liší o daný počet alel (3., 6., 9., 12. a 15. sloupec) a pokud byli z jedné populace, byli pro další analýzy označeni jako klony. Šedivě jsou zvýrazněny klony nespádající do jedné populace ({25\_1, 25\_4, 42\_2, 42\_5}, {27\_3, 28\_2, 28\_4, 27\_5, 27\_7, 28\_2, 28\_4}, {51\_1, 54\_11}).

| vzorek | identický<br>genotyp | odlišných alel | vzorek | identický<br>genotyp | odlišných alel | vzorek | identický<br>genotyp | odlišných alel | vzorek | identický<br>genotyp | odlišných alel | vzorek | identický<br>genotyp | odlišných alel |
|--------|----------------------|----------------|--------|----------------------|----------------|--------|----------------------|----------------|--------|----------------------|----------------|--------|----------------------|----------------|
| 1_1    | 1_5                  | 0              | 2_3    | 2_8                  | 1              | 31_4   | 31_8                 | 1              | 5_2    | 5_6                  | 0              | 59_1   | 59_5                 | 1              |
| 1_1    | 1_9                  | 0              | 2_3    | 2_8                  | 1              | 31_6   | 31_8                 | 1              | 5_2    | 5_8                  | 2              | 59_1   | 59_9                 | 0              |
| 1_1    | 1_13                 | 0              | 2_6    | 2_8                  | 0              | 32_37  | 32_43                | 0              | 5_2    | 5_10                 | 2              | 59_14  | 59_5                 | 1              |
| 1_5    | 1_9                  | 0              | 25_1   | 25_4                 | 0              | 32_37  | 32_58                | 0              | 5_6    | 5_8                  | 2              | 59_14  | 59_9                 | 0              |
| 1_5    | 1_13                 | 0              | 25_1   | 42_2                 | 2              | 32_43  | 32_58                | 0              | 5_6    | 5_10                 | 2              | 59_5   | 59_9                 | 1              |
| 1_9    | 1_13                 | 0              | 25_1   | 42_5                 | 2              | 33_4   | 33_35                | 0              | 5_8    | 5_10                 | 0              | 6_7    | 6_8                  | 0              |
| 12_4   | 12_7                 | 1              | 25_4   | 42_2                 | 2              | 36_1   | 36_3                 | 0              | 51_1   | 54_11                | 0              | 6_7    | 6_9                  | 0              |
| 12_4   | 12_10                | 0              | 25_4   | 42_5                 | 2              | 36_1   | 36_6                 | 0              | 52_1   | 52_5                 | 0              | 6_8    | 6_9                  | 0              |
| 12_7   | 12_10                | 1              | 26_3   | 26_5                 | 0              | 36_1   | 36_8                 | 2              | 52_11  | 52_8                 | 1              | 60_10  | 60_4                 | 2              |
| 13_1   | 13_4                 | 0              | 26_3   | 26_7                 | 0              | 36_3   | 36_6                 | 0              | 53_1   | 53_3                 | 0              | 61_1   | 61_4                 | 0              |
| 13_1   | 13_7                 | 0              | 26_5   | 26_7                 | 0              | 36_3   | 36_8                 | 2              | 53_1   | 53_6                 | 0              | 62_1   | 62_3                 | 0              |
| 13_1   | 13_10                | 0              | 27_3   | 27_5                 | 0              | 36_6   | 36_8                 | 2              | 53_1   | 53_9                 | 0              | 63_1   | 63_2                 | 0              |
| 13_4   | 13_7                 | 0              | 27_3   | 27_7                 | 1              | 37_1   | 37_3                 | 1              | 53_3   | 53_6                 | 0              | 64_1   | 64_12                | 2              |
| 13_4   | 13_10                | 0              | 27_3   | 28_2                 | 0              | 37_1   | 37_6                 | 0              | 53_3   | 53_9                 | 0              | 64_1   | 64_5                 | 0              |
| 13_7   | 13_10                | 0              | 27_3   | 28_4                 | 1              | 37_1   | 37_9                 | 0              | 53_6   | 53_9                 | 0              | 64_1   | 64_9                 | 0              |
| 14_5   | 14_9                 | 0              | 27_5   | 27_7                 | 1              | 37_3   | 37_6                 | 1              | 54_1   | 54_4                 | 0              | 64_12  | 64_5                 | 2              |
| 16_3   | 16_8                 | 0              | 27_5   | 28_2                 | 0              | 37_3   | 37_9                 | 1              | 54_1   | 54_8                 | 0              | 64_12  | 64_9                 | 2              |
| 16_3   | 16_10                | 0              | 27_5   | 28_4                 | 1              | 37_6   | 37_9                 | 0              | 54_4   | 54_8                 | 0              | 64_5   | 64_9                 | 0              |
| 16_8   | 16_10                | 0              | 27_7   | 28_2                 | 1              | 40_1   | 40_4                 | 0              | 55_1   | 55_3                 | 0              | 66_1   | 66_5                 | 1              |
| 18_2   | 18_4                 | 0              | 27_7   | 28_4                 | 0              | 40_1   | 40_7                 | 0              | 56_1   | 56_10                | 0              | 67_1   | 67_4                 | 0              |
| 18_2   | 18_6                 | 1              | 28_2   | 28_4                 | 1              | 40_1   | 40_10                | 1              | 56_1   | 56_4                 | 0              | 68_1   | 68_3                 | 0              |
| 18_2   | 18_8                 | 1              | 28_6   | 28_9                 | 0              | 40_4   | 40_7                 | 0              | 56_1   | 56_7                 | 0              | 69_1   | 69_5                 | 0              |
| 18_4   | 18_6                 | 1              | 29_1   | 29_9                 | 0              | 40_4   | 40_10                | 1              | 56_10  | 56_4                 | 0              | 7_1    | 7_10                 | 2              |
| 18_4   | 18_8                 | 1              | 29_4   | 29_7                 | 0              | 40_7   | 40_10                | 1              | 56_10  | 56_7                 | 0              | 70_1   | 70_10                | 0              |
| 18_6   | 18_8                 | 0              | 3_9    | 3_12                 | 0              | 41_1   | 41_9                 | 2              | 56_4   | 56_7                 | 0              | 70_1   | 70_4                 | 0              |
| 19_1   | 19_4                 | 0              | 30_1   | 30_2                 | 0              | 41_4   | 41_7                 | 0              | 57_1   | 57_11                | 0              | 70_1   | 70_7                 | 0              |
| 19_1   | 19_5                 | 0              | 30_1   | 30_4                 | 0              | 42_2   | 42_5                 | 0              | 57_1   | 57_4                 | 0              | 70_10  | 70_4                 | 0              |
| 19_1   | 19_7                 | 0              | 30_1   | 30_5                 | 0              | 43_1   | 43_2                 | 0              | 57_1   | 57_8                 | 0              | 70_10  | 70_7                 | 0              |
| 19_4   | 19_5                 | 0              | 30_2   | 30_4                 | 0              | 43_4   | 43_5                 | 0              | 57_11  | 57_4                 | 0              | 70_4   | 70_7                 | 0              |
| 19_4   | 19_7                 | 0              | 30_2   | 30_5                 | 0              | 46_1   | 46_4                 | 0              | 57_11  | 57_8                 | 0              | 71_1   | 71_4                 | 0              |
| 19_5   | 19_7                 | 0              | 30_4   | 30_5                 | 0              | 46_8   | 46_11                | 0              | 57_4   | 57_8                 | 0              | 8_1    | 8_4                  | 0              |
| 2_1    | 2_3                  | 1              | 31_1   | 31_4                 | 1              | 48_9   | 48_12                | 2              | 58_1   | 58_4                 | 0              | 8_1    | 8_7                  | 0              |
| 2_1    | 2_6                  | 0              | 31_1   | 31_6                 | 1              | 49_1   | 49_4                 | 0              | 58_1   | 58_6                 | 0              | 8_1    | 8_10                 | 0              |
| 2_1    | 2_8                  | 0              | 31_1   | 31_8                 | 0              | 49_1   | 49_7                 | 0              | 58_4   | 58_6                 | 0              | 8_4    | 8_7                  | 0              |
| 2_3    | 2_6                  | 1              | 31_4   | 31_6                 | 0              | 49_4   | 49_7                 | 0              | 59_1   | 59_14                | 0              | 8_4    | 8_10                 | 0              |

## 4.2 Analýza molekulární variance (AMOVA)

Analýza molekulární variance byla počítána metodou shodných alel ( $F_{ST}$ -like výpočet) pro 4 datové soubory (viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90). Zásadní rozdíl je vidět mezi tabulkami 4.6 a 4.7, kdy míra variability mezi jedinci v rámci populace je pro rybníky daleko větší (39,9 %), než pro řeky (10,7 %). Tabulka 4.5 a tabulka 4.8 se výrazně neliší, což je dáno zahrnutím říčních i rybníčních populací do analýzy, je vidět vysoká míra variability mezi populacemi (80,2 %; 78,8 %), rozdělení do geografických skupin v tab. 4.8 vysvětlilo pouze 5,2% variability. Vysoké fixační indexy  $F_{ST}$  u všech analýz (0,8; 0,89; 0,6; 0,84) ukazují na vysoký stupeň izolovanosti jednotlivých populací.

Tabulka 4.5: AMOVA všech populací rákosu počítaná programem Arlequin metodou  $F_{ST}$  (podílem shodných alel). Výpočet byl testován 10 000 permutacemi a  $p < 0,001$ . Tabulka udává míru variability mezi populacemi v rámci celého datového souboru (80,2 %) a míru variability mezi jedinci v rámci populace (19,8 %). Fixační index  $F_{ST}$  ukazující rozdělení genetické variability na jednotlivých úrovních je relativně vysoký (0,8), ukazuje na fixování různých alel pro různé populace.

| zdroj variability             | stupně volnosti | suma čtverců | variabilita komponent | procento variability |
|-------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| mezi populacemi               | 59              | 1448,267     | 6,8                   | 80,2                 |
| mezi jedinci v rámci populace | 142             | 238,417      | 1,6                   | 19,8                 |
| celkem                        | 201             | 1686,683     | 8,4                   |                      |
| fixační index $F_{ST} = 0,8$  |                 |              |                       |                      |

Tabulka 4.6: AMOVA počítaná pro říční populace v rámci jednotlivých geografických území (viz dodatek A.3) pouze pro říční populace rákosu programem Arlequin metodou  $F_{ST}$  (podílem shodných alel). Výpočet byl testován 10 000 permutacemi a  $p < 0,001$ . Tabulka udává míru variability mezi jednotlivými skupinami (7,5 %), mezi populacemi v rámci geografických skupin (81,8 %) a mezi jedinci v rámci populace (10,7 %). Fixační index  $F_{ST}$  ukazující rozdělení genetické variability na jednotlivých úrovních je vysoký (0,89), ukazuje na fixování různých alel pro různé populace.

| zdroj variability               | stupně volnosti | suma čtverců | variabilita komponent | procento variability |
|---------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| mezi skupinami                  | 7               | 263,941      | 0,6                   | 7,5                  |
| v rámci skupiny mezi populacemi | 36              | 820,008      | 7                     | 81,8                 |
| mezi jedinci v rámci populace   | 98              | 89,417       | 0,9                   | 10,7                 |
| celkem                          | 141             | 1173,366     | 8,5                   |                      |
| fixační index $F_{ST} = 0,89$   |                 |              |                       |                      |

Tabulka 4.7: AMOVA počítaná pro populace z rybníků programem Arlequin metodou  $F_{ST}$  (podílem shodných alel). Výpočet byl testován 10 000 permutacemi a  $p < 0,001$ . Tabulka udává míru variability mezi jednotlivými populacemi (60,1 %) a mezi jedinci v rámci populace (39,9 %). Fixační index  $F_{ST}$  ukazující rozdělení genetické variability na jednotlivých úrovních je vysoký (0,6), ukazuje na fixování různých alel pro různé populace.

| zdroj variability             | stupně volnosti | suma čtverců | variabilita komponent | procento variability |
|-------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| mezi populacemi               | 15              | 337,7        | 5,1                   | 60,1                 |
| mezi jedinci v rámci populace | 44              | 149          | 3,4                   | 39,9                 |
| celkem                        | 59              | 486,7        | 8,5                   |                      |
| fixační index $F_{ST} = 0,6$  |                 |              |                       |                      |

Tabulka 4.8: AMOVA počítaná pro populace z vybraných geografických území (viz dodatek A.2) pro říční i rybníční populace rákosu programem Arlequin metodou  $F_{ST}$  (podílem shodných alel). Výpočet byl testován 10 000 permutacemi a  $p < 0,001$ . Tabulka udává míru variability mezi jednotlivými skupinami (5,2 %), mezi populacemi v rámci geografických skupin (78,8 %) a mezi jedinci v rámci populace (16 %). Fixační index  $F_{ST}$  ukazující rozdělení genetické variability na jednotlivých úrovních je vysoký (0,84), ukazuje na fixování různých alel pro různé populace.

| zdroj variability               | stupně volnosti | suma čtverců | variabilita komponent | procento variability |
|---------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| mezi skupinami                  | 3               | 117,563      | 0,4                   | 5,2                  |
| v rámci skupiny mezi populacemi | 37              | 833,482      | 6,7                   | 78,8                 |
| mezi jedinci v rámci populace   | 89              | 121,917      | 1,4                   | 16                   |
| celkem                          | 129             | 8,57463      | 8,5                   |                      |
| fixační index $F_{ST} = 0,84$   |                 |              |                       |                      |



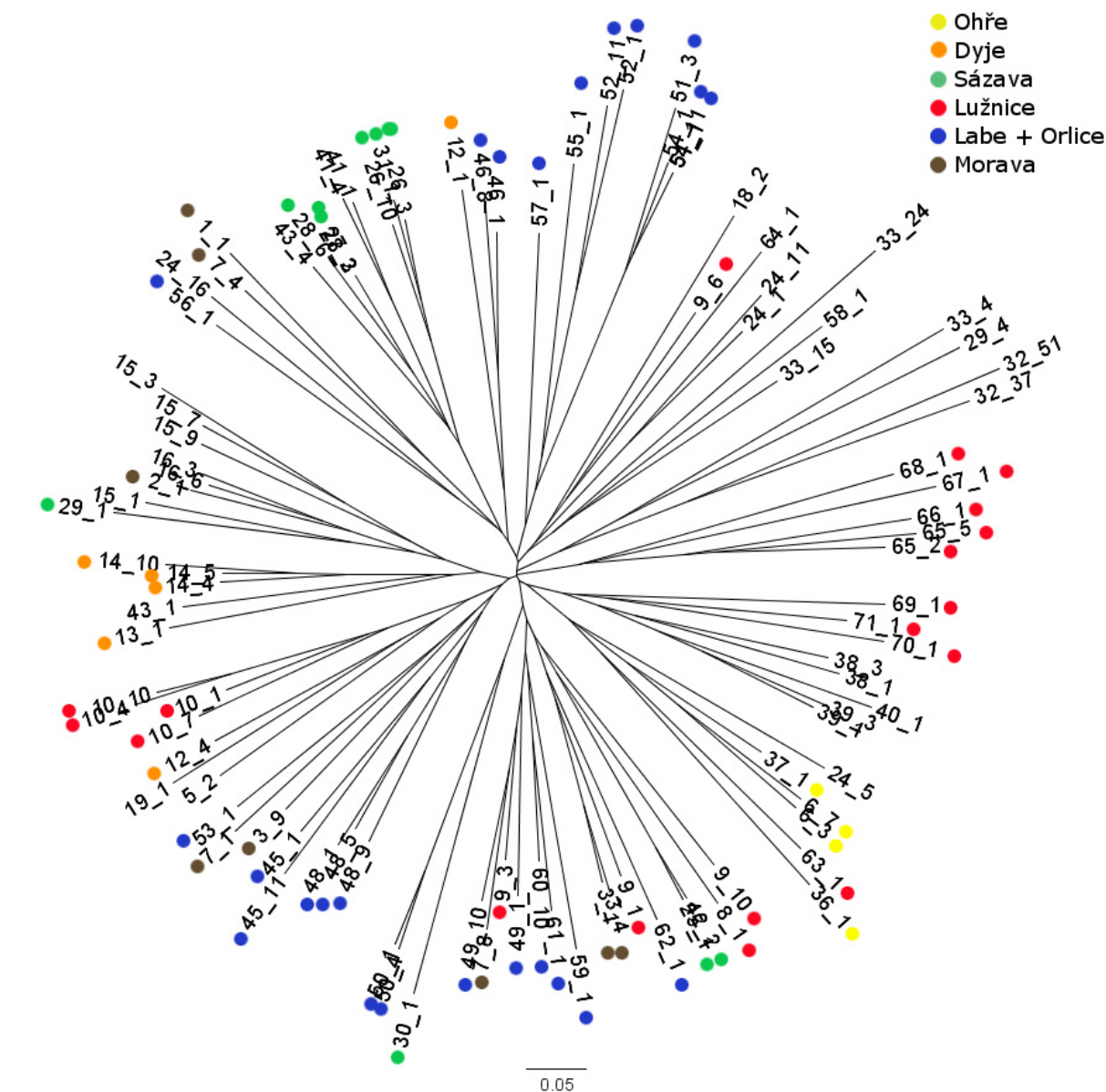
### 4.3 Analýza fylogenetické příbuznosti

Nezakoreňený strom byl vytvořen metodou Neighbour joining programem FAMD (Schlütter et Harris, 2006) na základě binárních datových matic 3 datových souborů (viz viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90) z bavených klonálních jedinců. Následně byl vizualizován a upraven v programu FigTree.

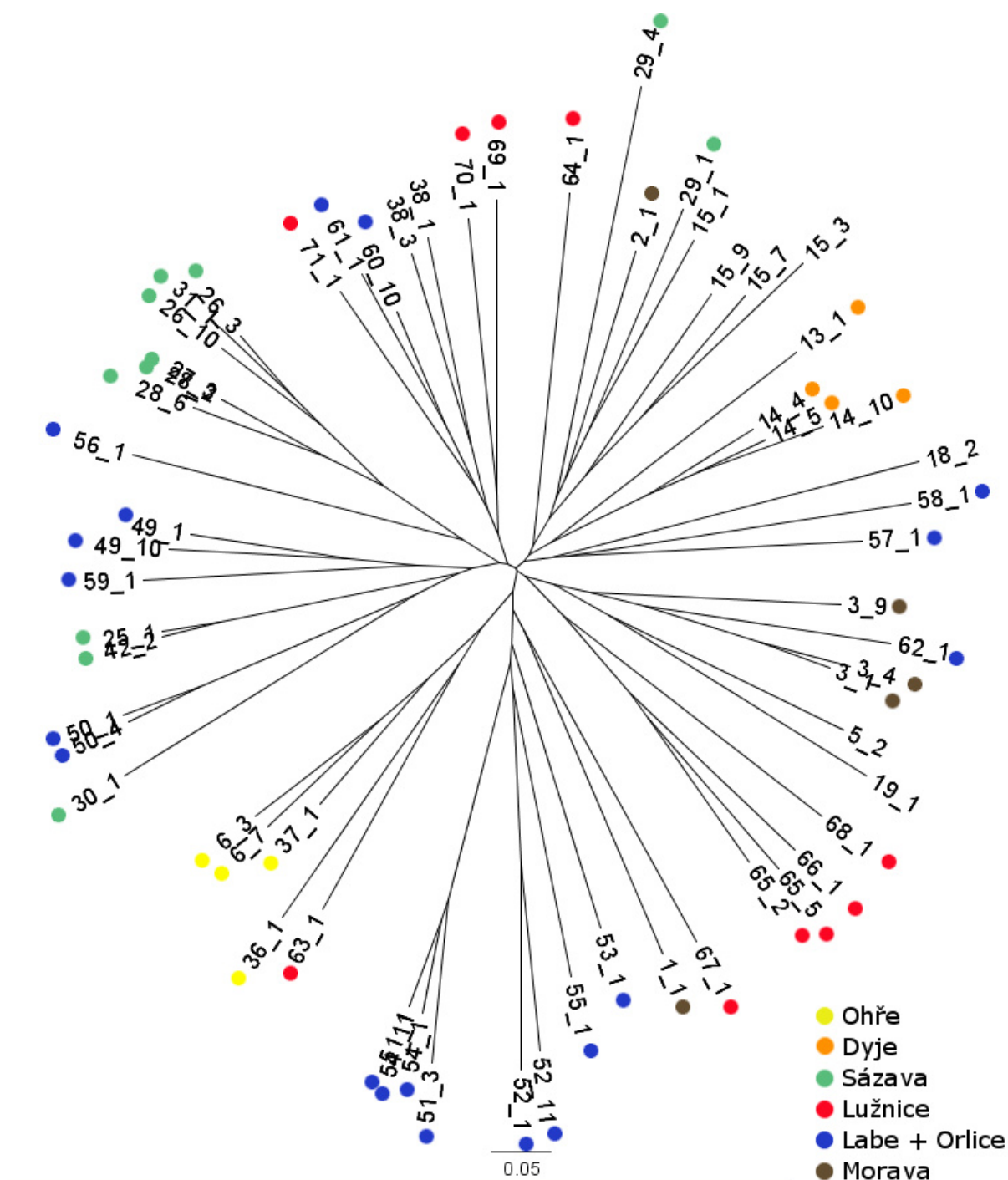
V analýze datové matice všech populací nedošlo k výraznému oddělení menších geografických celků (viz obr. 4.3), nejspíše z důvodu vysoké genetické variability mezi populacemi. Dobře se oddělila populace Jihlavy (18\_2), dále můžeme vidět jednobarevné větve zobrazující populace Ohře (žlutá barva), populace Dyje (oranžová barva, 13 a 14), Lužnice (červené body). Vltavská populace z Pražské Tróje (pop. 42) vykazuje silnou podobnost s populací ze Sázavy (pop. 25). U oblastí, kde byl velký počet analyzovaných populací, došlo k seskupení několika populací do společné větve, ať už z oblasti Sázavy (zelené body), Lužnice nebo Labe a Orlice (modré body). Populace Moravy (hnědé body) nevytvořily oddělený celek. Rozdělení některých jedinců z populace do různých částí stromu ukazuje na vysokou vnitropopulační variabilitu (např. pop33, pop24, pop7)

Při analýze pouze říčních populací (obr. 4.4) došlo opět k seskupení všech populací z Ohře (žluté body) a Dyje (oranžové body) a izolaci populace z Jihlavy (18\_2). Jinak strom vykazuje obdobné rysy – oddělení některých populací ze Sázavy (zelené body), Lužnice (červené body), Labe a Orlice (modré body), Morava nevytvořila samostatnou větev, populace se nachází roztroušeně po celém stromu.

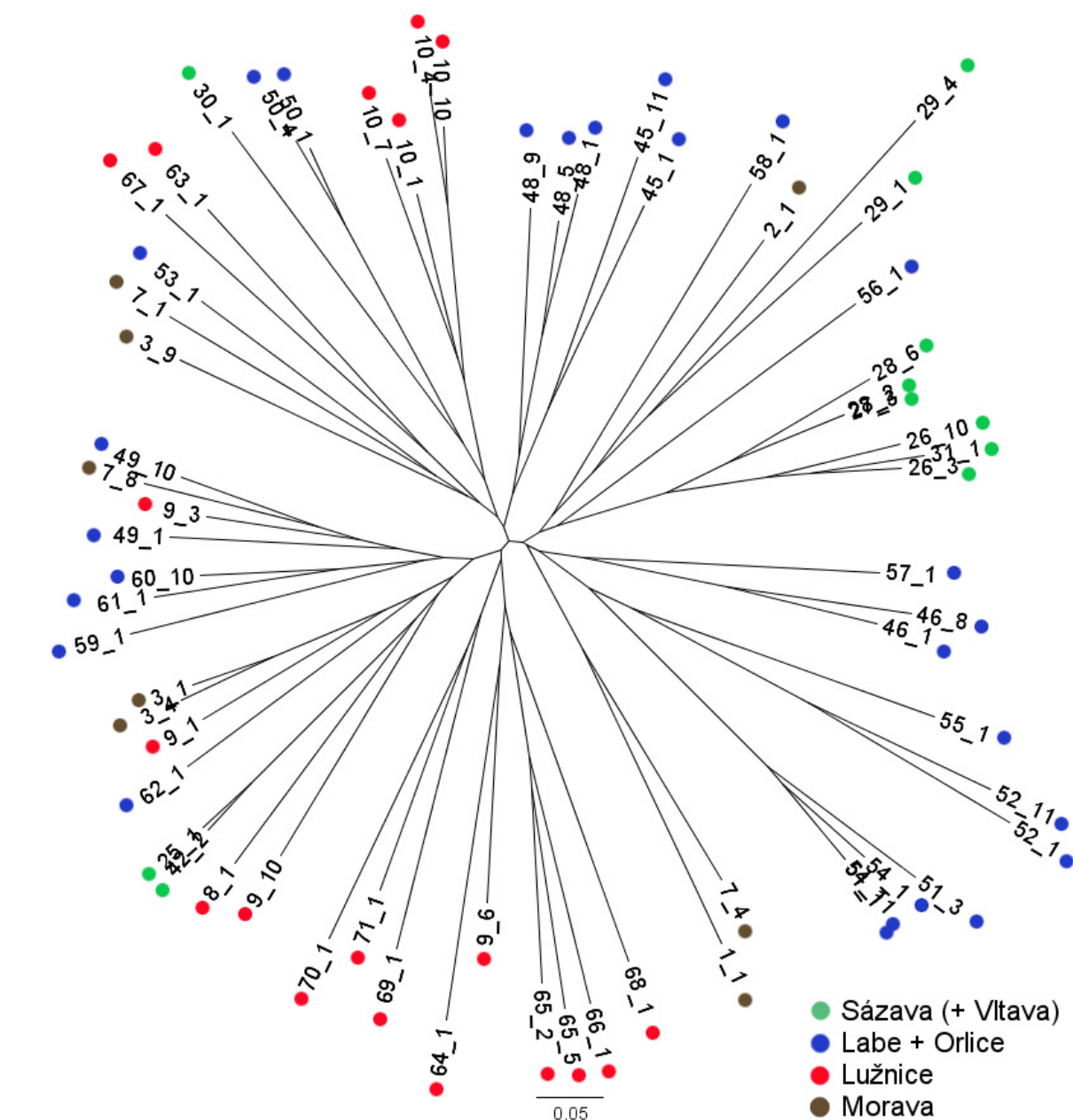
V analýze dat z vybraných geografických oblastí (obr. 4.5) je rozdělení populací dle příslušnosti k oblasti patrnější a setkáváme se zde s obdobnými výsledky jako u předchozích stromů. Za povšimnutí stojí stále zachovalá izolovanost populace z Labského kanálu (pop. 50), silná podobnost vedle sebe rostoucích populací 51 a 54, oboje z datového souboru Labe + Orlice. V datovém souboru Lužnice došlo ke sdružení populací 9, 64, 65 a 68, rostoucích v oblasti Novořeckých močálů, populací 69, 70, 71 rostoucích u Veselí n. Lužnicí. V oblasti Sázavy došlo k seskupení populací 26, 27, 28 a 31. Morava nevytvořila jasně oddělený shluk jedinců.



Obrázek 4.3: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour joining pro datovou matici všech vzorků zbavenou vnitropopulačních klonů vytvořený programem FAMD a vizualizovaný programem FigTree. Z obrázku není patrné větší geografická závislost, míra genetické variability mezi populacemi je vysoká, ale některé vzorky z určitých oblastí se dostaly blízko sebe (Ohře – žluté body, Dyje – oranžové body, Sázava – zelené body, Labe a Orlice – modré body, Lužnice – červené body). Rozdělení některých populací do různých částí stromu ukazuje i na vysokou vnitropopulační variabilitu (pop33, pop24, pop7).



Obrázek 4.4: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour joining pro datovou matici vzorků říčních populací zbavenou vnitropopulačních klonů vytvořený programem FAMD a vizualizovaný programem FigTree. Došlo k oddělení populací z povodí Ohře (žluté body), Jihlavy (bod 18\_2), některých populací z Lužnice (červené body), Sázavy (zelené body) i Labe s Orlicí (modré body). Populace povodí Moravy nevytvořili společnou větev (hnědé body). Struktura ale není jednoznačně patrná, míra genetické variability mezi populacemi je vysoká a dochází k častému spojení vzdálených (a pravděpodobně nesouvisejících) populací do jedné větve.

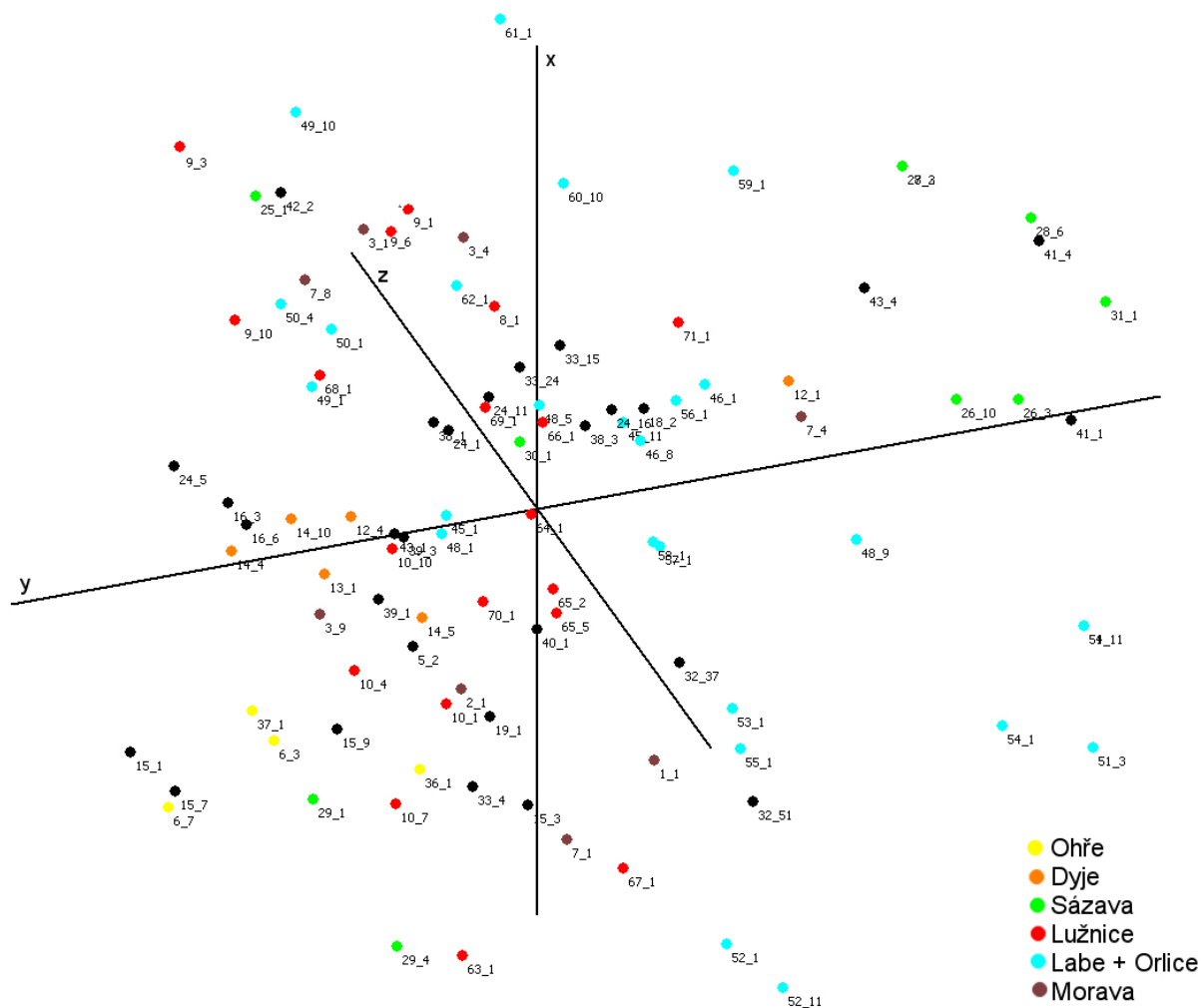


Obrázek 4.5: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour joining pro datovou matici vzorků z vybraných geografických oblastí zbavenou vnitropopulačních klonů vytvořený programem FAMD a vizualizovaný programem FigTree. Došlo k oddělení vždy několika populací z oblasti do jedné větve pro populace ze Sázavy (zelené body), Lužnice (červené body) i Labe s Orlicí u Hradce Králové (modré body). U Moravy nedošlo k oddělení většího počtu vzorků.

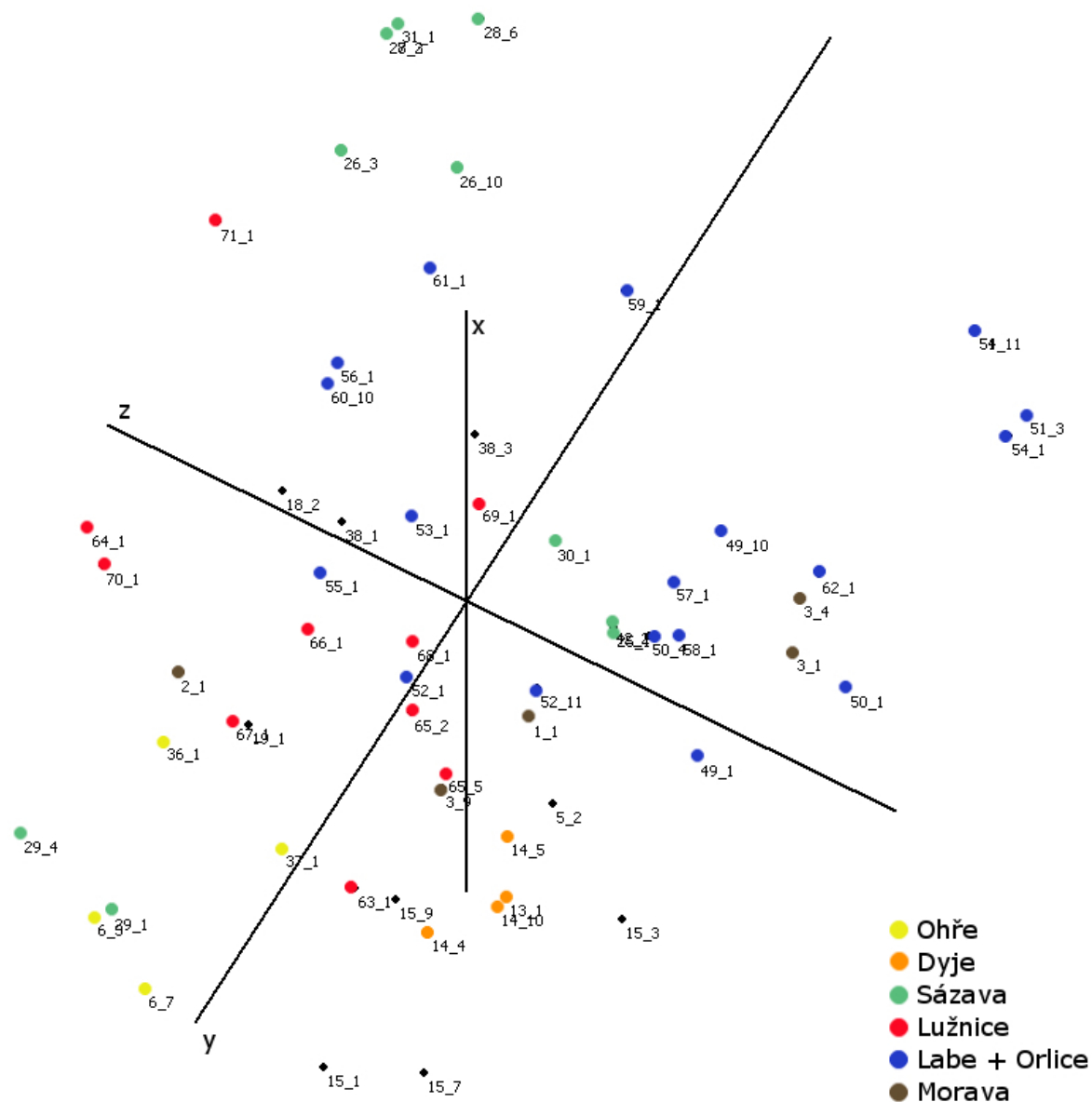
#### 4.4 Shlukování jedinců podle PCoA

Analýza PCoA neukázala silnější rozlišení, geografické oblasti nevytvořily dobře oddělené shluky. Jedinou výjimkou by mohly být populace 6, 36 a 37 z Ohře a 13 a 14 z Dyje. Na všech grafech také vidíme shluk Vltavské populace z Prahy (pop42) s populací ze Sázavy (pop25) a jasné prostorové oddělení shluku populací 51 a 54 rostoucích blízko sebe z Hradce Králové.

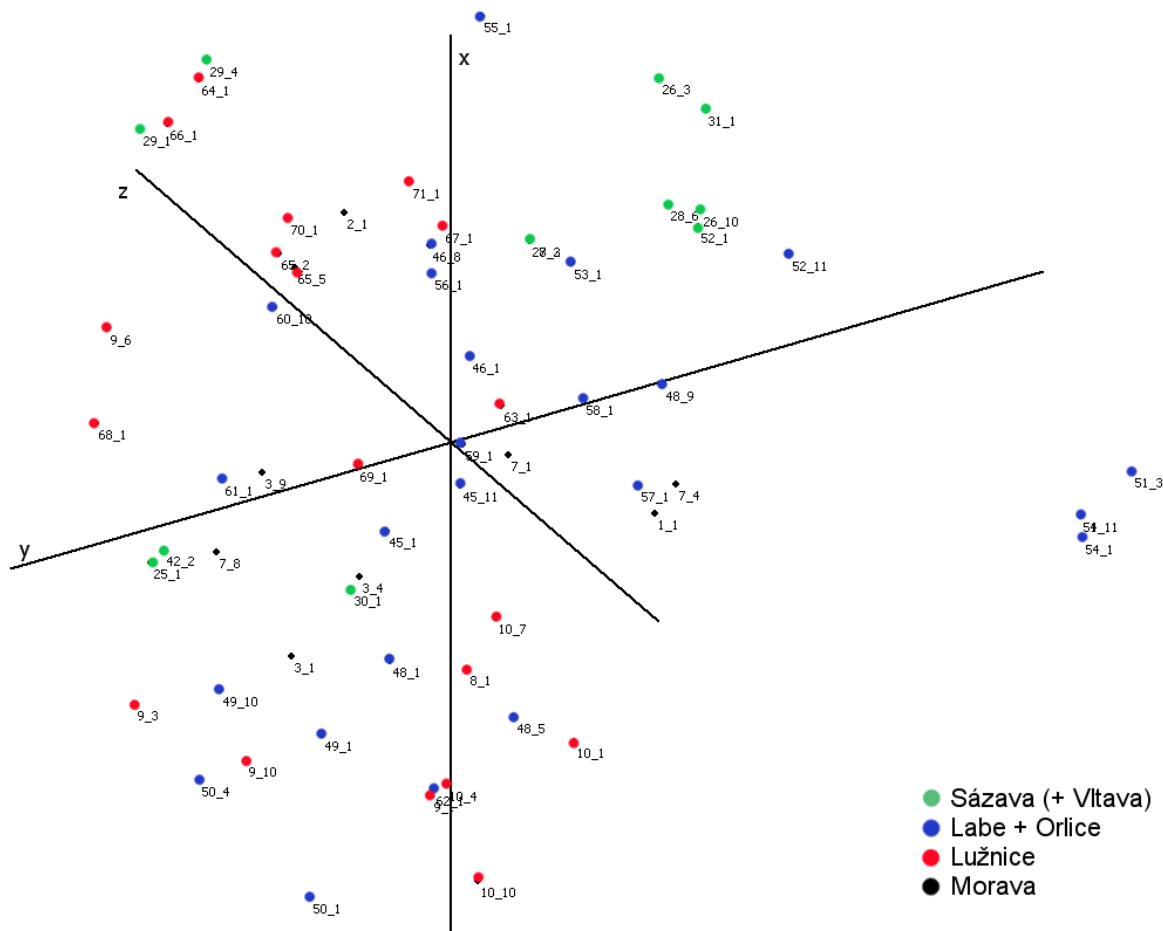
Na obrázku 4.6 vidíme PCoA pro všechny vzorky bez výraznějšího rozlišení větších geografických oblastí. Dobře se oddělila pouze Ohře, dvě populace Dyje, některé populace Sázavy a několik populací z Královéhradecka. Zobrazené osy trojrozměrného grafu vysvětlují 10,4 %, 8,11 % a 7,24% pozorované variability. Po odebrání rybníčních populací (obr. 4.7) došlo ke zvýšení vysvětlené variability trojrozměrným prostorem. Zobrazené osy grafu vysvětlují 13,5 %, 10,39 % a 8,21 % pozorované variability. Dobře se oddělily populace Ohře a Dyje. Ostatní povodí tvoří několik shluků různě rozmístěných po ordinačním prostoru. Podobný trend zobrazuje i PCoA na obr 4.8 pro populace z vybraných geografických oblastí – Sázavy, Lužnice, Moravy a Královéhradecka. Zde zobrazené osy grafu vysvětlují 12,6 %, 10,74 % a 9,51 % pozorované variability, opět je vidět oddělení shluku populací z Ohře a následně shluky pro vybrané populace z oblastí.



Obrázek 4.6: PCoA jedinců rákosu obecného zobrazující všechny populace. Osa x ukazuje 10,4 %, osa y 8,11 % a osa z 7,24 % pozorované variability. Relativně dobře se oddělily pouze populace z Ohře (žluté body) a Dyje (oranžové body) a některé populace z Královéhradecka (modré body) a Sázavy (zelené body). Ostatní populace jsou promíchané a není v nich vidět žádné dobře oddělené shluky odpovídající geograficky vzdáleným populacím.



Obrázek 4.7: PCoA jedinců rákosu obecného zobrazující všechny říční populace. Osa x ukazuje 13,5 %, osa y 10,39 % a osa z 8,21 % pozorované variability. Nejlépe se oddělily populace z Ohře (žluté body), Dyje (oranžové body) a populace z Jihlavy (ačkoliv se nedá hovořit o shluku, neboť je tvořena pouze jedním bodem 18\_2). Ostatní geografické oblasti – Sázava (+ Vltava v Praze) (zelené body), Orlice a Labe u Hradce Králové (modré body) i populace Lužnice (červené body) – vykazují izolovanost vždy jen několika populací dané lokality tvořící menší shluky. Populace Moravy nevytvořily shluky.



Obrázek 4.8: PCoA jedinců rákosu obecného zobrazující vybrané geografické oblasti (viz dodatek A.3, str. 95). Osa x ukazuje 12,6 %, osa y 10,74 % a osa z 9,51 % pozorované variability. Žádné geografické území se neoddělilo úplně, došlo ke shluknutí vždy několika populací z dané oblasti na některém místě grafu (oblast Sázavy – zelené body, Labe + Orlice – modré body, Lužnice – červené body, Moravy – černé body).



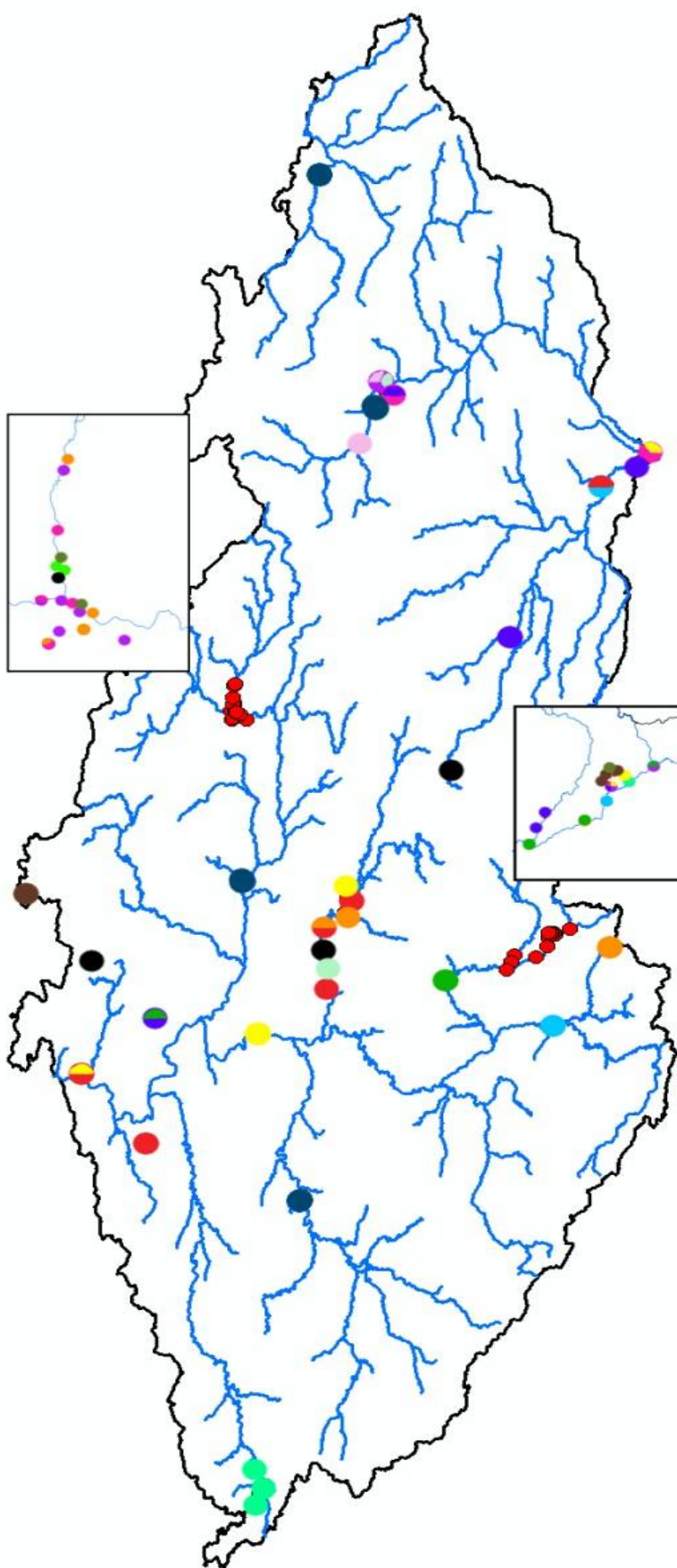
## 4.5 Bayesovské shlukování

Bayesovské shlukování realizované v programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen, 2007) bylo provedeno na 3 datových maticích (matice se všemi vzorky, matice s říčními populacemi, matice s vybranými geografickými oblastmi; viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90) skórovaných podle Saltonstall (2003) zbavených klonů v jednotlivých populacích.

Pro matici se všemi vzorky rozdělil program 101 jedinců ze 60 populací do 21 shluků (s pravděpodobností 0,9044) (tab. 4.9), soubor dat s 44 říčními populacemi a 62 jedinci do 23 shluků (s pravděpodobností 0,25) a matici tvořenou vybranými geografickými oblastmi se 64 jedinci z 49 populací do 29 shluků (s pravděpodobností 0,6). Ani v jednom souboru dat nedošlo k výraznému oddělení větších geografických celků, nejspíše z důvodu vysoké mezipopulační genetické diverzity. Do samostatných clusterů se vyčlenily říční populace Jihlavy a Ohře. Z oblasti Moravy došlo ke shluknutí populace 1 a 7. Do stejného clusteru se vždy shlukly populace 25 a 42 ze Sázavy a Vltavy (Praha). Oblasti tvořené více analyzovanými populacemi se v tabulce 4.10 a 4.11 rozpadly do několika clusterů, některé clustery jsou tvořené pouze danou oblastí (tabX2: cluster 2, 5, 10, 9, 21, 22; tabX3: 1,2, 4, 5, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 19), v některých došlo ke shluknutí s jinými geografickými oblastmi. Na obrázku 4.9 vidíme grafické znázornění rozdělení jedinců do shluků pro matici všech populací.

Tabulka 4.9: Bayesovské shlukování pro všechny vzorky rákosu v programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen, 2007) rozdělilo 101 jedinců z původních 60ti populací do 21 shluků s pravděpodobností 0,9. Rozdělení do shluků nevykazuje téměř žádný vztah s geografickou strukturou dat. Výjimku tvoří populace 6, 36, 37 z Ohře v clusteru 4, populace 18 z Jihlavy v clusteru 7 a populace 1 a 7 z Moravy v clusteru 5. V clusteru 1 došlo k shluknutí populací 3 rybníků z jižních Čech (7, 9, 24) a populací z Hradce králové (45, 49, 50, 56, 59, 61). Shluk populací z Hradce Králové je také v clusteru 10 (46, 48, 57, 60). Data opět ukazují na vysokou mezipopulační diverzitu.

|  |           |        |
|--|-----------|--------|
| počet analyzovaných jedinců  |           | 101    |
| počet shluků (clusterů)  |           | 21     |
| pravděpodobnost počtu shluků   |           | 0,9044 |
| Cluster 1: {7_8, 9_6, 24_16, 45_1, 45_11, 49_10, 50_1, 50_4, 56_1, 59_1, 61_1} |           |        |
| Cluster 2: {5_2, 10_1, 10_4, 10_7, 10_10, 12_4}                                |           |        |
| Cluster 3: {32_37, 32_51}  |           |        |
| Cluster 4: {6_3, 6_7, 36_1, 37_1, 63_1}  |           |        |
| Cluster 5: {1_1, 7_4}  |           |        |
| Cluster 6: {3_1, 3_4, 9_1, 14_4, 14_10, 48_1, 48_5, 49_1, 58_1, 62_1}          |           |        |
| Cluster 7: {18_2}  |           |        |
| Cluster 8: {12_1, 26_3, 26_10, 28_6, 31_1, 41_1, 41_4, 43_4}                   |           |        |
| Cluster 9: {2_1, 15_1, 15_3, 15_7, 15_9, 16_3, 16_6, 19_1}                     |           |        |
| Cluster 10: {8_1, 27_3, 28_2, 46_1, 46_8, 48_9, 57_1, 60_10}                   |           |        |
| Cluster 11: {9_10, 14_5, 25_1, 42_2, 43_1, 64_1}                               |           |        |
| Cluster 12: {51_1, 51_3, 54_1, 54_13}  |           |        |
| Cluster 13: {3_9, 9_3, 13_1, 38_1, 38_3, 39_1, 69_1, 70_1}                     |           |        |
| Cluster 14: {33_4, 65_2, 65_5, 66_1, 68_1}                                     |           |        |
| Cluster 15: {52_1, 52_11}  |           |        |
| Cluster 16: {33_24}  |           |        |
| Cluster 17: {7_1, 30_1}  |           |        |
| Cluster 18: {53_1, 55_1, 67_1}   |           |        |
| Cluster 19: {24_1, 24_5, 24_11, 39_3, 40_1, 71_1}                              |           |        |
| Cluster 20: {33_15}  |           |        |
| Cluster 21: {29_1, 29_4}   |           |        |
| pravděpodobnost různých počtů clusterů   |           |        |
| 20   | 0,01239   |        |
| 21   | 0,9044    |        |
| 22   | 0,08295   |        |
| 23   | 0,0000995 |        |
| 24   | 0,0001334 |        |



Obrázek 4.9: Grafické znázornění rozdělení jedinců do shluků vytvořených na základě Bayesovského shlukovacího programu BAPS 3.2. Každý shluk má svou barvu, černými body jsou označeny populace, které vytvořili vlastní shluk. Můžeme vidět dobře oddělenou skupinu z Ohře a vyčlenění několika populací ze stejného území do společného clusteru.

Tabulka 4.10 Bayesovské shlukování pro všechny říční populace rákosu v programu BAPS 3.2 (Corander et Martinen, 2007) rozdělilo 62 jedinců z původních 44 populací do 23 shluků s velmi nízkou pravděpodobností 0,25. Jak ukazuje pravděpodobnost dalších počtů clusterů, není tento počet shluků zcela průkazný. Část populací z Labe a Orlice se shlukla do clusterů 2, 5 a 10. Populace z Lužnice se oddělily od zbylých oblastí v clusterech 9, 21, 22. Izolovaná do samostatného clusteru 3 je populace z Jihlavy. 2 populace z Ohře se oddělily do clusteru 14. Samostatný cluster 20 vytvořila i populace ze Sázavy a Pražské Tróje.

|  |         |
|--|---------|
| počet analyzovaných jedinců                      | 62      |
| počet shluků (clusterů)                          | 23      |
| pravděpodobnost počtu shluků                     | 0,25    |
| Cluster 1: {27_3, 28_2, 59_1, 60_10, 61_1, 71_1} |         |
| Cluster 2: {53_1, 55_1, 64_1}                    |         |
| Cluster 3: {18_2}                                |         |
| Cluster 4: {3_9, 70_1}                           |         |
| Cluster 5: {51_1, 51_3, 54_1, 54_11}             |         |
| Cluster 6: {15_1, 15_7, 15_9}                    |         |
| Cluster 7: {2_1, 5_2, 19_1}                      |         |
| Cluster 8: {13_1, 15_3, 57_1}                    |         |
| Cluster 9: {63_1, 67_1}                          |         |
| Cluster 10: {3_1, 49_1, 49_10, 50_1, 50_4, 62_1} |         |
| Cluster 11: {26_3, 26_10, 28_6, 31_1}            |         |
| Cluster 12: {1_1}                                |         |
| Cluster 13: {36_1}                               |         |
| Cluster 14: {6_3, 6_7, 37_1}                     |         |
| Cluster 15: {38_1, 38_3}                         |         |
| Cluster 16: {52_1, 52_11}                        |         |
| Cluster 17: {56_1, 68_1}                         |         |
| Cluster 18: {30_1}                               |         |
| Cluster 19: {3_4, 14_4, 14_5, 14_10, 58_1}       |         |
| Cluster 20: {25_1, 42_2}                         |         |
| Cluster 21: {69_1}                               |         |
| Cluster 22: {65_2, 65_5, 66_1}                   |         |
| Cluster 23: {29_1, 29_4}                         |         |
| pravděpodobnost různých počtů clusterů           |         |
| 21   | 0,09606 |
| 22   | 0,2273  |
| 23   | 0,2555  |
| 24   | 0,1403  |
| 25   | 0,1948  |
| 26   | 0,08599 |

Tab 4.11: Tabulka Bayesovské shlukování pro populace z vybraných geografických oblastí (viz. dodatek A.3 str. 95) v programu BAPS 3.2 (Corander et Marttinen, 2007) rozdělilo 64 jedinců z původních 49 populací do 20 shluků s pravděpodobností 0,6. Shluky obsahující pouze populace z Lužnice: 4, 9, 18, 19, populace z Moravy: 1, populace ze Sázavy: 13, 16, Královéhradecka: 2, 5, 10, 11, 14. Velké shluky (7 a 17) jsou tvořené populacemi z různých oblastí a ukazují na vysokou mezipopulační diverzitu.

|   |        |
|---|--------|
| počet analyzovaných jedinců   | 64     |
| počet shluků (clusterů)   | 20     |
| pravděpodobnost počtu shluků  | 0,6233 |
| Cluster 1: {1_1, 7_4}   |        |
| Cluster 2: {46_8, 57_1}   |        |
| Cluster 3: {2_1, 48_1, 48_5, 48_9}  |        |
| Cluster 4: {68_1}   |        |
| Cluster 5: {51_1, 51_3, 54_1, 54_11}                                      |        |
| Cluster 6: {7_1, 30_1}  |        |
| Cluster 7: {3_1, 3_4, 7_8, 9_1, 9_3, 9_6, 49_1, 49_10, 62_1}              |        |
| Cluster 8: {10_1, 10_4, 10_7, 10_10, 50_1, 50_4}                          |        |
| Cluster 9: {63_1, 67_1}   |        |
| Cluster 10: {58_1}  |        |
| Cluster 11: {52_1, 52_11}   |        |
| Cluster 12: {3_9, 70_1}   |        |
| Cluster 13: {26_3, 26_10, 28_6, 31_1}                                     |        |
| Cluster 14: {53_1, 55_1}  |        |
| Cluster 15: {9_10, 64_1, 71_1}  |        |
| Cluster 16: {25_1, 42_2}  |        |
| Cluster 17: {8_1, 27_3, 28_2, 45_1, 45_11, 46_1, 56_1, 59_1, 60_10, 61_1} |        |
| Cluster 18: {69_1}  |        |
| Cluster 19: {65_2, 65_5, 66_1}  |        |
| Cluster 20: {29_1, 29_4}  |        |
| pravděpodobnost různých počtů clusterů                                    |        |
| 19  | 0,3767 |
| 20  | 0,6233 |

## 4.6 Shlukování podle programu Structure

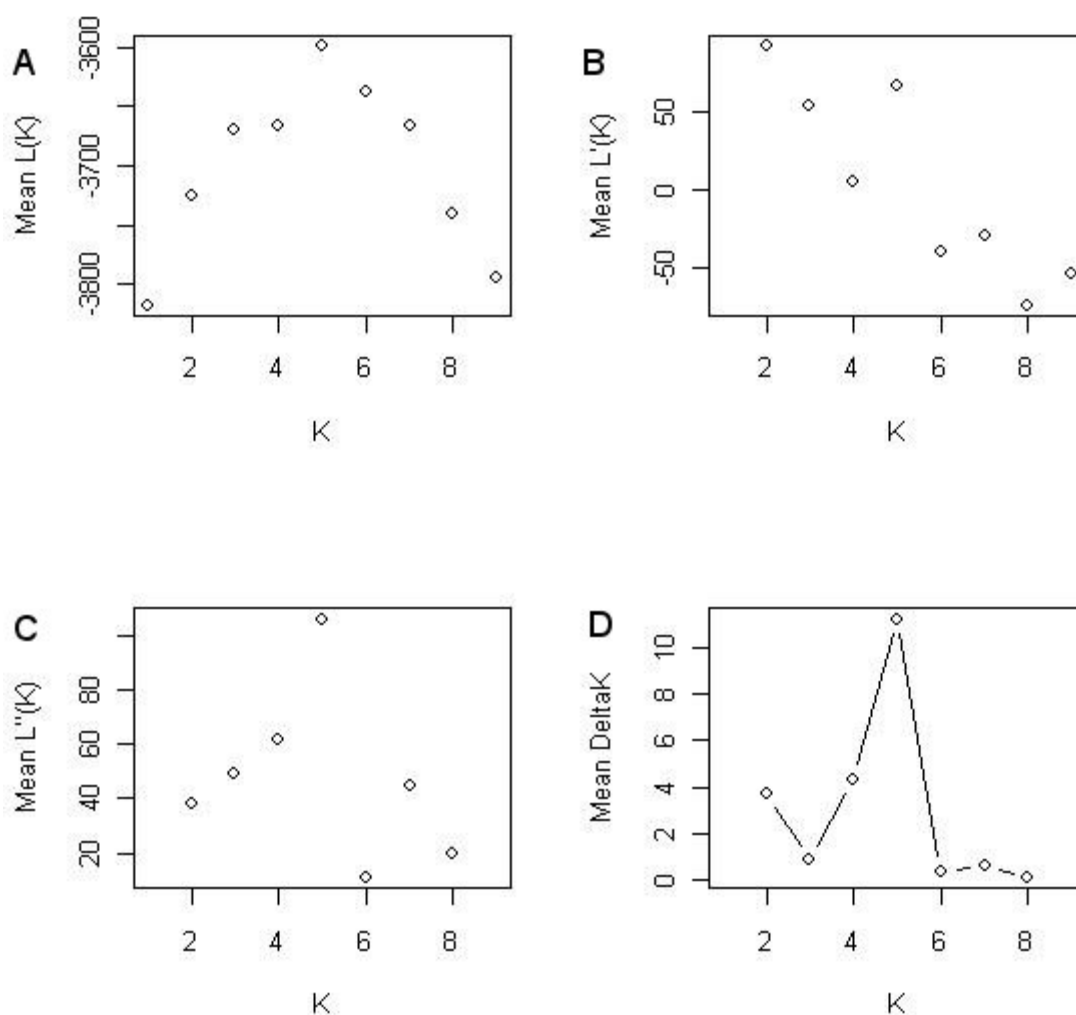
Jako nejlepší počet shluků ( $K$ ) pro datovou matici všech vzorků bez klonů vyšlo rozdělení do pěti (s nejvyšším  $\Delta K$ , vysokým logaritmem věrohodnosti i koeficientem podobnosti opakování jednotlivých výpočtů) nebo čtyř skupin (s vysokým  $\Delta K$ , pravděpodobností a nejvyšším koeficientem opakování jednotlivých výpočtů). Grafy pomáhající zvolit optimální počet skupin  $K$  jsou na obr. 4.10. Ukazují pravděpodobnost modelu rozdělovacího jedince do daného počtu skupin  $K$  a změnu pravděpodobnosti mezi běhy programu pro různé předem určené počty skupin  $K$ . Míra podobnosti mezi jednotlivými běhy programu je na obr. 4.11. Vysoká podobnost mezi jednotlivými výpočty pro daný počet skupin znamená vysokou stabilitu takového rozdělení jedinců a jeho vysokou pravděpodobnost. Na obr. 4.12 je podobnost mezi jednotlivými páry běhů algoritmu. Pro určení nejlepšího počtu skupin je důležité nejen vysoké  $\Delta K$ , ale také vysoký koeficient podobnosti (similarity coefficient, Falush et al., 2003) jednotlivých běhů programu vyjádřený malou směrodatnou odchylkou (tj. při všech nezávislých opakování výpočtu dojde ke stejnému nebo velmi podobnému rozdělení jedinců do skupin). Výsledné rozdělení jedinců do shluků je na obr. 4.13.

Pro rozdělení jedinců do 5 skupin mluví vysoké  $\Delta K$ , ale toto rozdělení nemá nejvyšší koeficient podobnosti a má větší směrodatnou odchylku, jednotlivé běhy pro tento počet skupin se tedy do jisté míry liší ve výsledcích. Proto se nabízí i rozdělení jedinců do 4 skupin, které nemá tak vysoké  $\Delta K$ , ale má nejvyšší koeficient podobnosti jednotlivých běhů a téměř nulovou směrodatnou odchylku.

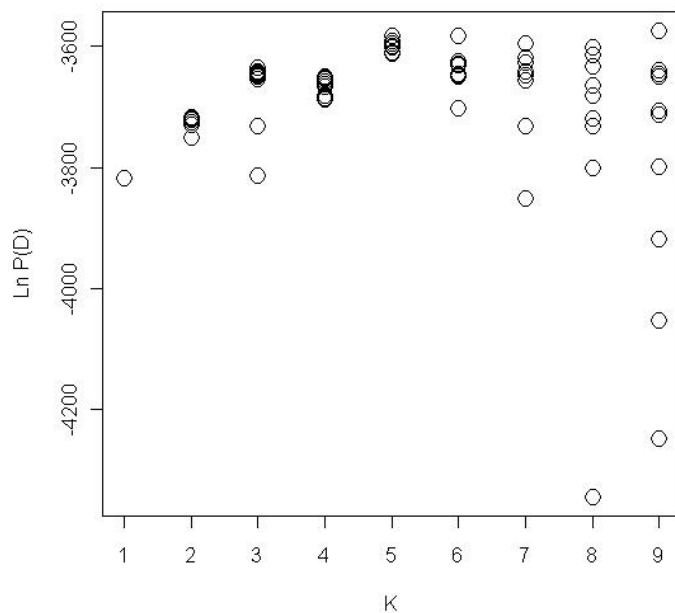
Vzhledem k rozdílům v jednotlivých bězích programu, jak pro pět shluků tak pro čtyři shluky, bylo všech 10 běhů vykresleno (viz dodatek C str. 102). Jednotlivé běhy pro 4 skupiny ani jednotlivé běhy pro 5 skupin se mezi sebou ale v zásadních bodech nelišily, většina rozdílů je v malých procentech příslušnosti k jednotlivým shukům u jedinců, kteří nejsou zcela přiřazeni. Drobné sloupečky u jedinců (cca do 20 % z délky sloupce) lze ignorovat jako falešně pozitivní. Sloupečky nad 20 % už vypovídají o příslušnosti jedince do daného shluku.

V případě rozdělení do čtyř i pěti skupin se odděluje několik populací Sázavy do zvláštního clusteru (hnědá barva graf A, žlutá barva graf B) a přidává se k nim pop. 41 (České Středohoří). Také se vyčleňují populace 51 a 54 (a z části i 52) z Hradce Králové (žlutá barva graf A, zelená barva graf B), populace 32, 33 (rybníky ze severních Čech) a 46 (rybník z Hradce Králové)(modrá barva graf A, červená barva graf B). V případě rozdělení

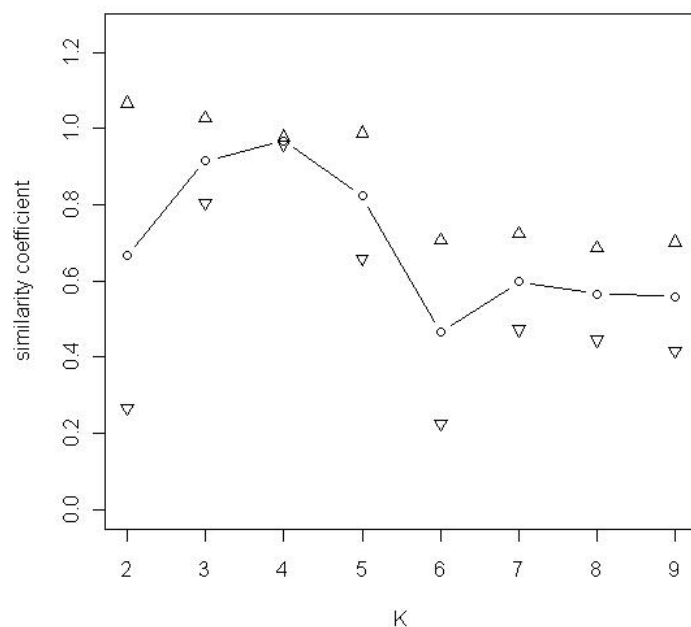
do 5 skupin dochází k vyčlenění několika populací (zelená barva) z jinak velkého shluku (na grafu A červená barva, na grafu B modrá), ale nejedná se o geograficky oddělenou skupinu. Na obou grafech je ale dobře patrné, které populace vykazují vysokou vnitropopulační diverzitu (15, 24, 29, 33, 45, 47, 7, 9). Geografická distribuce genetických shluků pro variantu s pěti shluky je na obr. 4.14, pro variantu se čtyřmi shluky na obr. 4.15.



Obrázek 4.10: Výstupy Structure-sum z datové matice všech vzorků bez klonů. Graf A ukazuje na svislé ose logaritmus pravděpodobnosti modelu optimálního rozdělení do daného počtu skupin  $K$  zobrazeného na vodorovné ose, jedná se o průměrnou hodnotu z 10 běhů programu. Čím vyšší je hodnota, tím vyšší je pravděpodobnost rozdělení do daného počtu skupin. Graf B ukazuje průměrnou míru změny pravděpodobnosti mezi výpočty s dvěma různými počty skupin ( $K$ ). Graf C ukazuje míru změny mezi dvěma páry běhu programu, tedy mezi dvěma body grafu B. Graf D ukazuje  $\Delta K$  získané jako průměr absolutních hodnot z grafu C za všechny běhy programu pro dané  $K$ . Jako nejlepší se ukazuje rozdělení jedinců do 5 skupin (má nejvyšší  $\Delta K$ ).  $K$  výběru nejlepšího počtu  $K$  slouží i další výstupy programu Structure, které srovnávají podobnost mezi jednotlivými běhy programu (obr. 4.11 a 4.12)

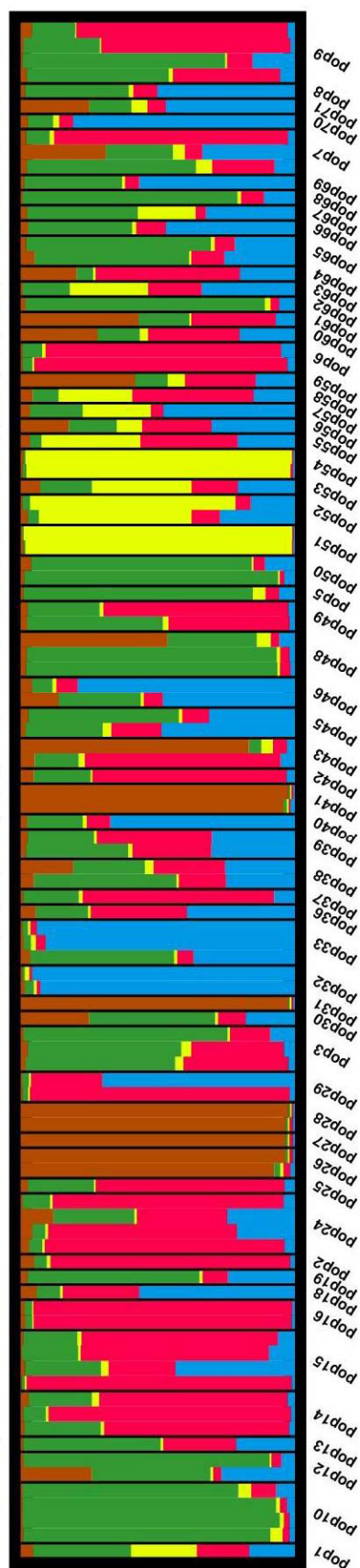


Obrázek 4.11: Podobnost jednotlivých běhů programu Structure pro určené počty shluků ( $K$ ) pro datovou matici všech vzorků bez klonů. Algoritmus s určeným maximálním počtem shluků (vodorovná osa) běžel pro každý výpočet 10x. Na svislé ose je logaritmus pravděpodobnosti modelu a optimálního rozdělení do daného počtu skupin ( $K$ ). Nejstabilnější výstupy jsou pro 4 a 5 shluků, ale ani jedno  $K$  nemá ideální rozdělení (tedy konzistentní výsledek pro všechna opakování jako je u  $K=1$ ).

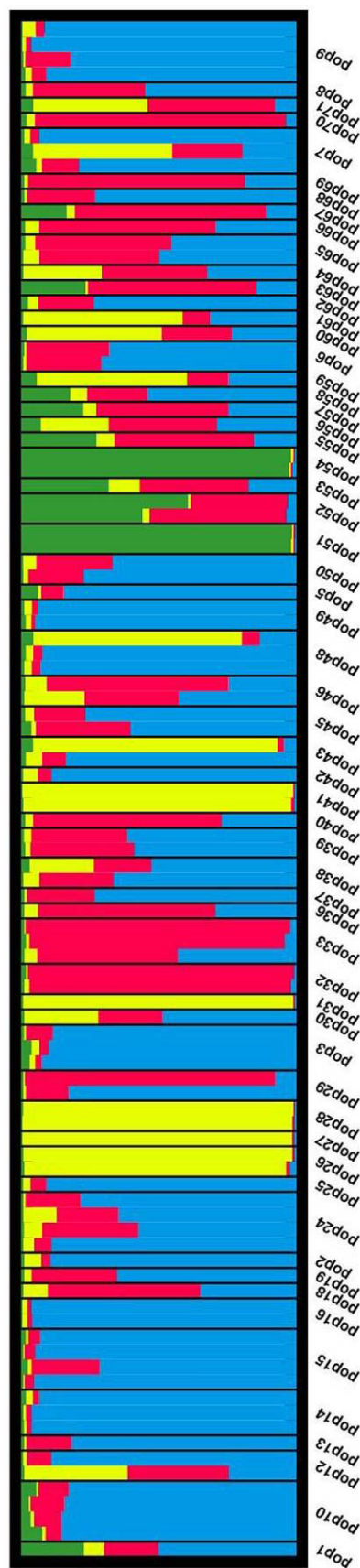


Obrázek 4.12: Koeficient podobnosti (svislá osa) mezi jednotlivými páry běhů programu Structure pro určený počet shluků ( $K$ , vodorovná osa) vypočítaný pro datovou matici všech vzorků zbavenou klonů. Algoritmus měl určený počet shluků  $K$ , pro každé  $K$  běžel výpočet 10x. Graf ukazuje průměrný koeficient podobnosti mezi páry běhů programu a směrodatnou odchylkou. Jako nejlepší vychází rozdělení do 4 shluků kvůli vysokému koeficientu podobnosti a malé směrodatné odchylce, dále do 3 a 5, které mají také celkem vysokou podobnost běhů.



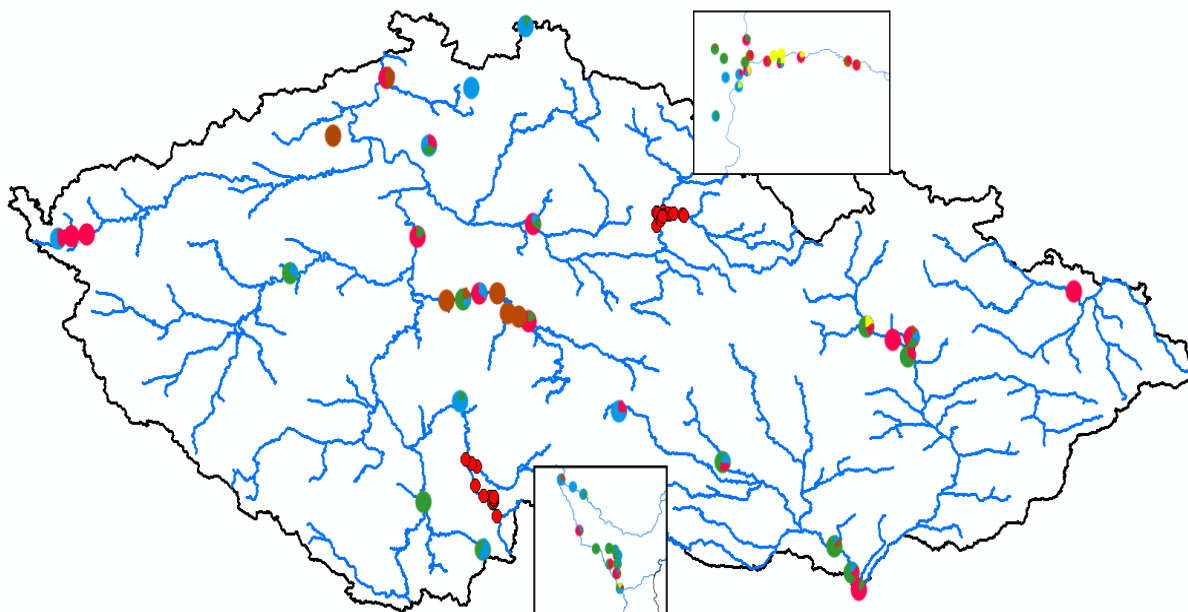


A (5)

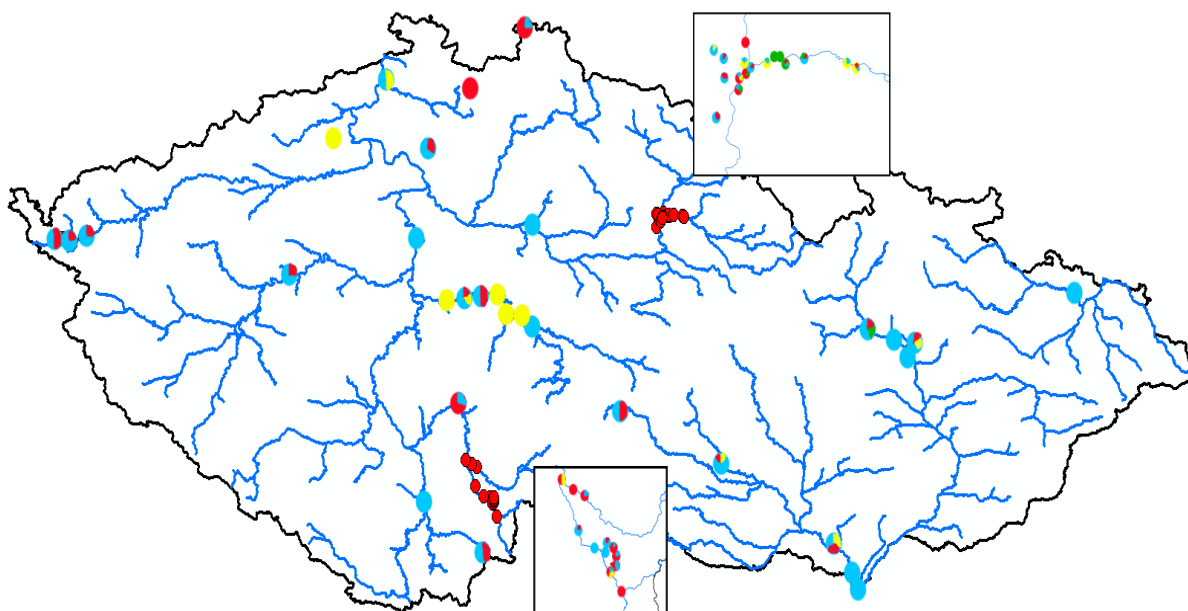


B (4)

Obrázek 4.13 – Shlukování jedinců do skupin programem Structure podle genetické podobnosti. Každý sloupeček je jeden jedinec dané populace. Je-li tento sloupeček jednobarevný, patří tento jedinec 100% do daného barevně odlišeného genetického shluku. Poměr barev ve sloupci odpovídá pravděpodobnosti příslušnosti daného jedince do daných barevně odlišených genetických shluků. Obr. A ukazuje rozdělení jedinců z daných populací do 5 shluků, obr. B ukazuje rozdělení do 4 shluků. V obou variantách dochází k jasnému oddělení populací 26, 27, 28, 31 a 41 (ze Sázavy a 41 z Českého Středohoří), populace 51 a 54 (a z části i 52) z Hradce Králové, populace 32, 33 (rybníky ze severních Čech) s populací 46 (rybník z Hradce Králové. Geografická distribuce jednotlivých shluků je znázorněna na mapách na obr. 4.14 a 4. 15.



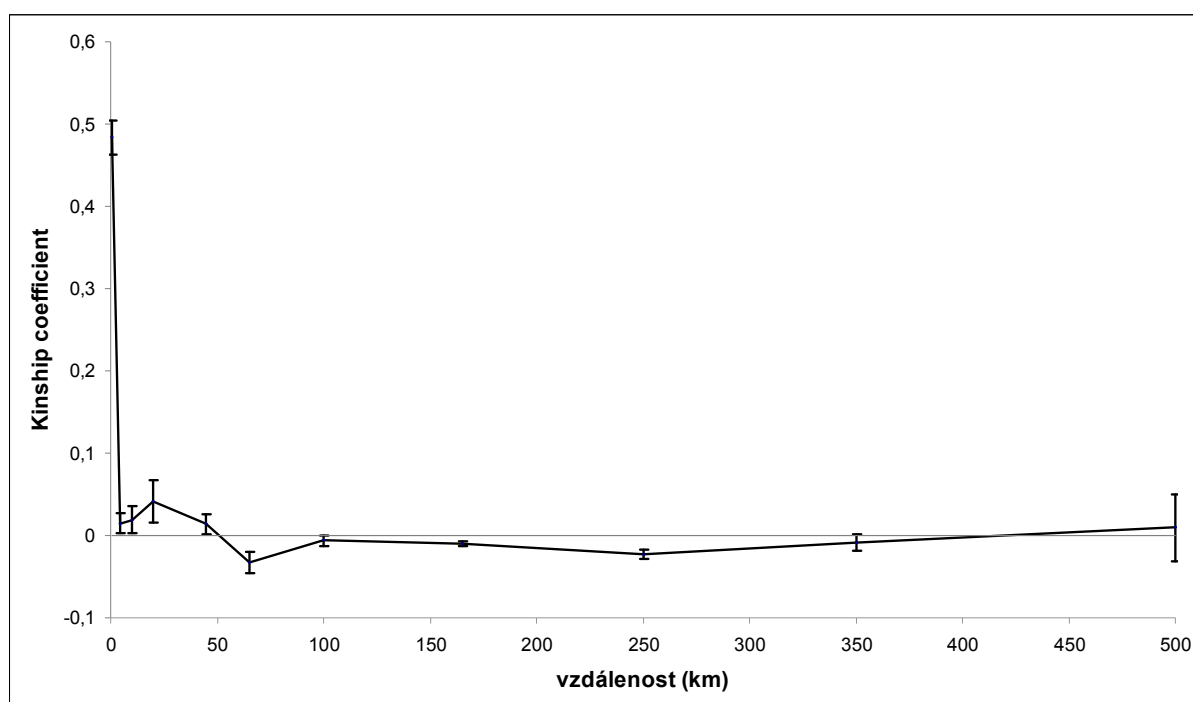
Obrázek 4.14: Geografická distribuce 5 genetických (barevně odlišených) shluků vypočítaných programem Structure a zobrazených na obr. 4.13 A (barvy jsou stejné) v rámci geografických oblastí.



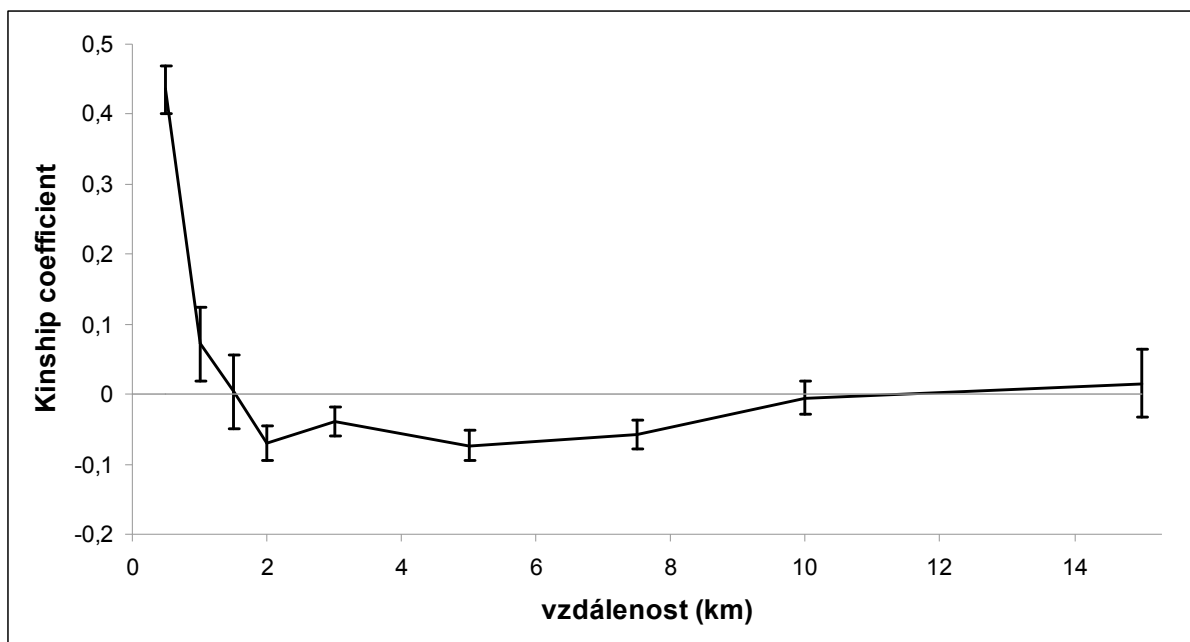
Obrázek 4.15: Geografická distribuce 4 genetických (barevně odlišených) shluků vypočítaných programem Structure a zobrazených na obr. 4.13 B (barvy jsou stejné) v rámci geografických oblastí.

## 4.7 Vztah genetické a geografické vzdálenosti

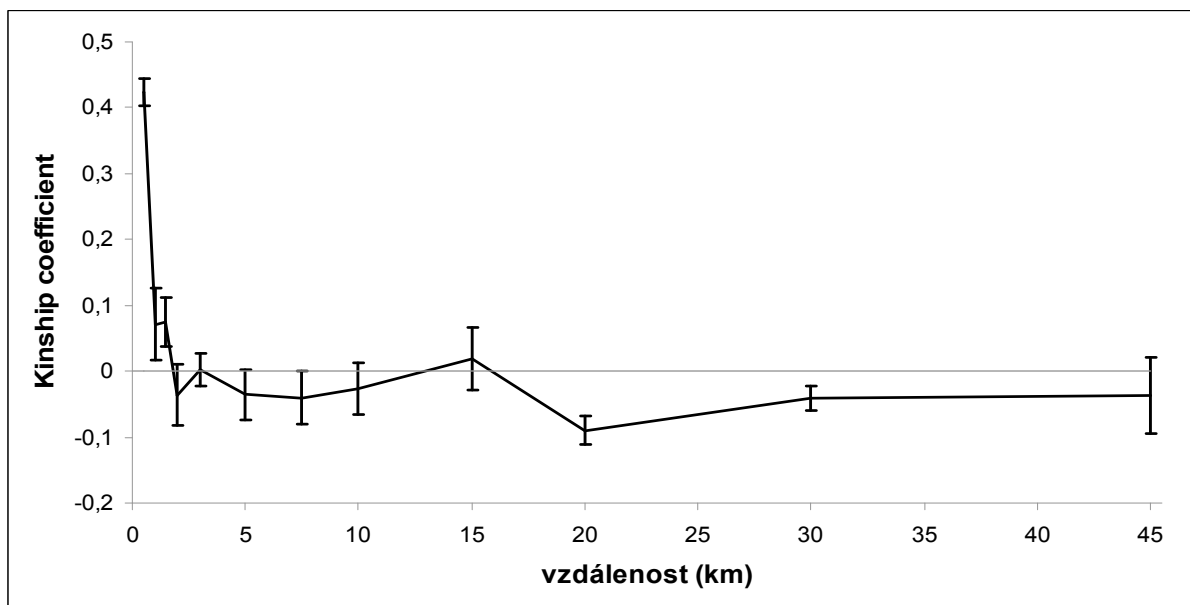
Měřením kinship autokorelačního koeficientu byla v datech rákosu obecného nalezena genetická podobnost mezi jedinci a byla dána do souvislosti s geografickou vzdáleností, přičemž se vzrůstem přímé geografické vzdálenosti mezi jedinci v průměru klesala (viz obr. 4.16, 4.1, 4.18, 4.19, 4.20). Bylo počítáno s přímými geografickými vzdálenostmi mezi všemi vzorky (202 vzorků, obr. 4.16), mezi vzorky z povodí Labe a Orlice u Hradce Králové (53 vzorků, obr. 4.17), z povodí Lužnice (34 vzorků, obr. 4.18), z povodí Moravy (16 vzorků, obr. 4.19) a z povodí Sázavy (27 vzorků, obr. 4. 20). Párová genetická vzdálenost obecně se vzdáleností klesá, u středních vzdáleností stagnuje nebo mírně narůstá. Jedinci jsou prostorově silněji autokorelování na velmi malé vzdálenosti (do 2 km), slabá korelace je až do zhruba 40 km (u matice ze všech vzorků). Vzdálenější jedinci jsou negativně autokorelování, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance). Výpočty shrnuje tabulka 4.12.



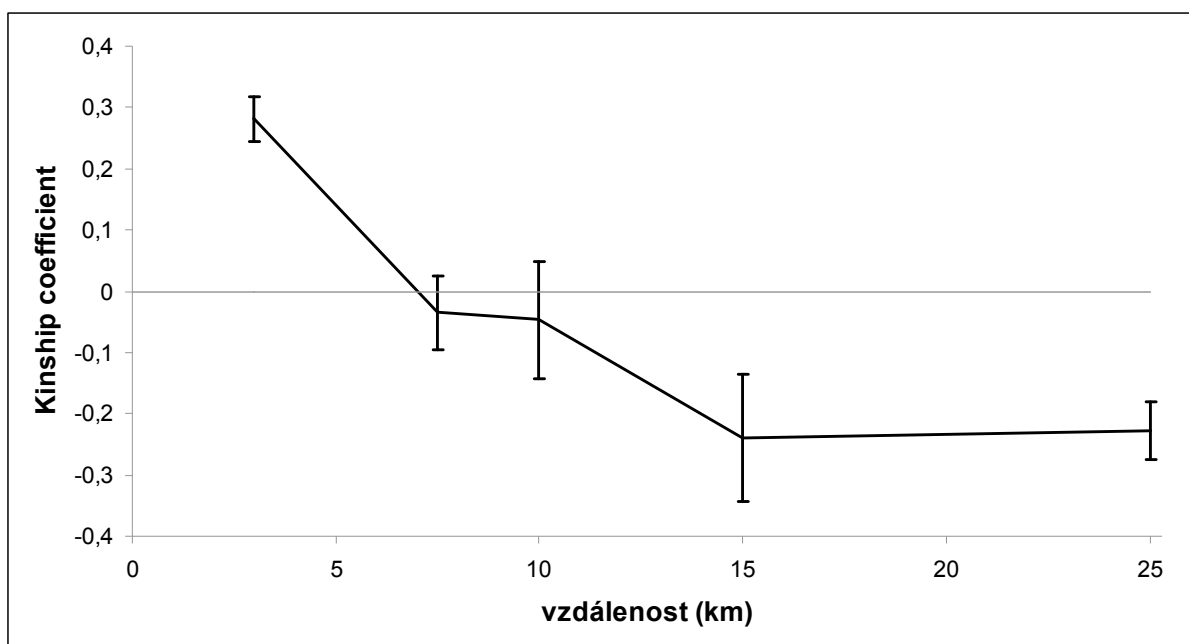
Obrázek 4.16: Prostorová autokorelace 202 vzorků z celé české republiky. Černá čára zobrazuje získané autokorelační kinship koeficienty (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab 4.12. U každého bodu je vyznačena svislou čarou standartní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou jakknife (15 000 opakování). Mezi vzdáleností 0,8 a 4,5 km dochází k prudkému poklesu párové genetické podobnosti mezi jedinci, dalších 40 km se pohybuje nad hranicí pozitivní autokorelace. Jedinci vzdálení více než asi 50 km již nejsou pozitivně autokorelování. Negativní korelace vzdálenějších jedinců naznačuje izolaci geografickou vzdáleností.



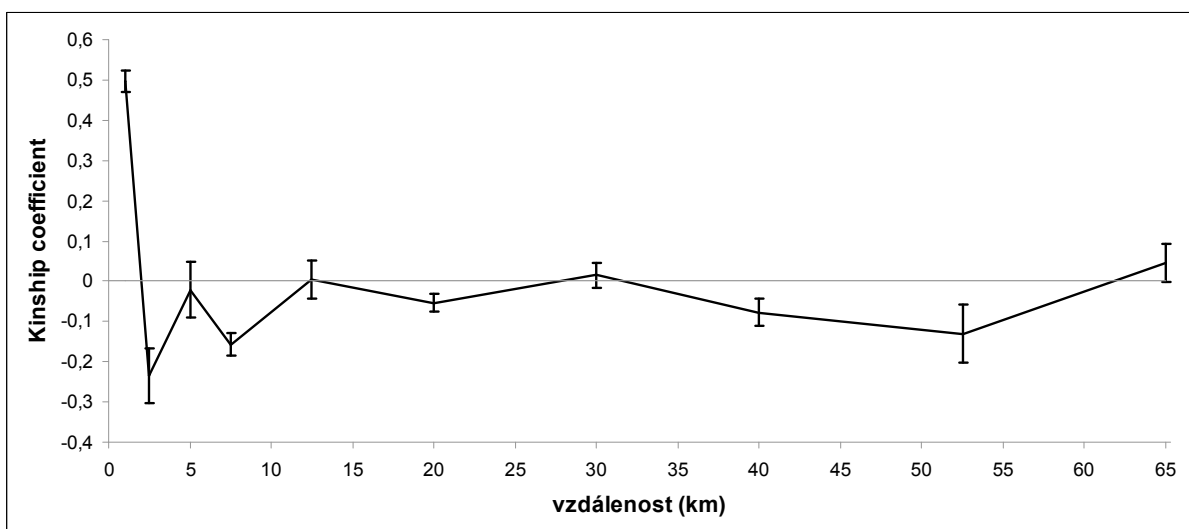
Obrázek 4.17: Prostorová autokorelace 53 vzorků z oblasti Labe a Orlice u Hradce Králové. Černá čára zobrazuje získané autokorelační kinship koeficienty (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.12. U každého bodu je vyznačena svislou čarou standartní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou jakcknife (15 000 opakování). První 2 km dochází k prudkému poklesu párové genetické podobnosti, následuje zhruba 6km stagnace a poté mírný nesignifikanční nárůst. Jedinci vzdálení zhruba 1 km už nejsou pozitivně autokorelativní. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelováni, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností.



Obrázek 4.18: Prostorová autokorelace 34 vzorků z oblasti Lužnice. Černá čára zobrazuje získané autokorelační kinship koeficienty (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.12. U každého bodu je vyznačena svislou čarou standartní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou jakcknife (15 000 opakování). První 2 km dochází k prudkému poklesu párové genetické podobnosti, následuje zhruba 13 km stagnace a poté opětovný pokles. Jedinci vzdálení zhruba 2 km už nejsou pozitivně autokorelativní. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelováni, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností.



Obrázek 4.19: Prostorová autokorelace 16 vzorků z oblasti Moravy. Černá čára zobrazuje získané autokorelační kinship koeficienty (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.12. U každého bodu je vyznačena svislou čarou standartní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou jakcknife (15 000 opakování). Prvních 7,5 km dochází k poklesu párové genetické podobnosti, následují zhruba 3km stagnace a následně opětovný pokles. Jedinci vzdálení zhruba 7 km už nejsou pozitivně autokorelativní, ale míra korelace je oproti ostatním povodím poměrně slabá. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelováni, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností.



Obrázek 4.20 – Prostorová autokorelace 27 vzorků z oblasti Sázavy. Černá čára zobrazuje získané autokorelační kinship koeficienty (svislá osa) a směrodatnou odchylku pro danou přímou geografickou vzdálenost mezi jedinci (vodorovná osa). Přehled vzdáleností pro jednotlivé vzdálenostní třídy je v tab. 4.12. U každého bodu je vyznačena svislou čarou standartní chyba koeficientu vzdálenosti odhadnutá procedurou jakcknife (15 000 opakování). Prvních 2,5 km dochází k prudkému poklesu párové genetické podobnosti, následuje nesignifikantní nárůst k 5km vzdálenosti, opětovný pokles a nárůst ke vzdálenosti 12,5 km. Zbýlých 50 km podobnost stagnuje. Jedinci vzdálení zhruba 2 km už nejsou pozitivně autokorelativní. Vzdálenější jedinci jsou negativně korelováni, což naznačuje izolaci geografickou vzdáleností.

Tab.4.12: Srovnání výpočtů kinship autokorelačního koeficientu v rámci všech vzorků z ČR, povodí Labe a Orlice u HK, Lužnice, Moravy a Sázavy. Grafy jsou uvedeny na obr. 4.16 až 4.20. Maximální vzdálenosti jednotlivých vzdálenostních tříd jsou udávány jako přímé geografické vzdálenosti v km. Nejmenší vzdálenostní třída pokrývá vnitropopulační úroveň. Vzdálenostní třídy pro jednotlivá povodí bylo nutné z důvodu nedostatku vzorků v některých oblastech upravit, stejné třídy jsou pro populace Labe a Orlice u Hradce Králové a Lužnici, kdy pro Labe a Orlici nejsou nejvyšší třídy definovány. Pro všechny datové matice platí, že kinship koeficient se vzdáleností klesá, blízcí jedinci jsou pozitivně korelováni, zatímco vzdálení negativně, což ukazuje na genetickou izolaci geografickou vzdáleností. Na nejvyšších vzdálenostech párová genetická podobnost mírně roste, ale ve všech případech nesignifikantně.

| Vzdálenostní třída                     | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     | 12    |
|--|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| všechny vzorky (viz obr,XX)            |      |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |       |
| maximální vzdálenost (km)              | 0,80 | 4,50  | 10,00 | 20,00 | 45,00 | 65,00 | 100,00 | 165,00 | 250,00 | 350,00 | 400,00 |       |
| počet párů                             | 360  | 978   | 654   | 388   | 724   | 558   | 3821   | 6218   | 5512   | 912    | 176    |       |
| průměrná vzdálenost (km)               | 0,12 | 2,67  | 6,89  | 14,70 | 30,28 | 53,12 | 86,48  | 134,44 | 196,46 | 287,81 | 373,27 |       |
| kinship koeficient                     | 0,48 | 0,01  | 0,02  | 0,04  | 0,01  | -0,03 | -0,01  | -0,01  | -0,02  | -0,01  | 0,01   |       |
| SE                                     | 0,02 | 0,01  | 0,02  | 0,03  | 0,01  | 0,01  | 0,01   | 0,00   | 0,01   | 0,01   | 0,04   |       |
| povodí Labe a Orlice u HK (viz obr,XX) |      |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |       |
| maximální vzdálenost (km)              | 0,50 | 1,00  | 1,50  | 2,00  | 3,00  | 5,00  | 7,50   | 10,00  | 15,00  |        |        |       |
| počet párů                             | 108  | 80    | 48    | 116   | 286   | 348   | 206    | 138    | 48     |        |        |       |
| průměrná vzdálenost (km)               | 0,11 | 0,74  | 1,15  | 1,84  | 2,60  | 4,00  | 6,10   | 8,86   | 10,92  |        |        |       |
| kinship koeficient                     | 0,44 | 0,07  | 0,00  | -0,07 | -0,04 | -0,07 | -0,06  | 0,00   | 0,02   |        |        |       |
| SE                                     | 0,03 | 0,05  | 0,05  | 0,03  | 0,02  | 0,02  | 0,02   | 0,02   | 0,05   |        |        |       |
| povodí Lužnice (viz obr,XX)            |      |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |       |
| maximální vzdálenost (km)              | 0,50 | 1,00  | 1,50  | 2,00  | 3,00  | 5,00  | 7,50   | 10,00  | 15,00  | 20,00  | 30,00  | 45,00 |
| počet párů                             | 41   | 12    | 20    | 16    | 60    | 48    | 44     | 16     | 16     | 104    | 152,00 | 32,00 |
| průměrná vzdálenost (km)               | 0,04 | 0,95  | 1,33  | 1,71  | 2,60  | 3,82  | 5,75   | 8,86   | 12,29  | 17,29  | 23,38  | 40,87 |
| kinship koeficient                     | 0,42 | 0,07  | 0,07  | -0,04 | 0,00  | -0,04 | -0,04  | -0,03  | 0,02   | -0,09  | -0,04  | -0,04 |
| SE                                     | 0,02 | 0,06  | 0,04  | 0,05  | 0,02  | 0,04  | 0,04   | 0,04   | 0,05   | 0,02   | 0,02   | 0,06  |
| povodí Moravy (viz obr,XX)             |      |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |       |
| maximální vzdálenost (km)              | 3,00 | 7,50  | 10,00 | 15,00 | 25,00 |       |        |        |        |        |        |       |
| počet párů                             | 40   | 16    | 16    | 16    | 32    |       |        |        |        |        |        |       |
| průměrná vzdálenost (km)               | 0,80 | 6,73  | 7,81  | 13,39 | 20,55 |       |        |        |        |        |        |       |
| kinship koeficient                     | 0,28 | -0,04 | -0,05 | -0,24 | -0,23 |       |        |        |        |        |        |       |
| SE                                     | 0,04 | 0,06  | 0,10  | 0,10  | 0,05  |       |        |        |        |        |        |       |

| Povodí Sázavy (viz obr,XX) |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| maximální vzdálenost (km)  | 1,00 | 2,50  | 5,00  | 7,50  | 12,50 | 20,00 | 30,00 | 40,00 | 52,50 | 65,00 |  |
| počet párů                 | 35   | 8     | 12    | 54    | 28    | 96    | 60    | 32    | 14    | 12    |  |
| průměrná vzdálenost (km)   | 0,00 | 1,04  | 4,25  | 6,34  | 11,77 | 16,49 | 25,20 | 33,62 | 46,11 | 55,97 |  |
| kinship koeficient         | 0,50 | -0,23 | -0,02 | -0,16 | 0,00  | -0,05 | 0,01  | -0,08 | -0,13 | 0,05  |  |
| SE                         | 0,03 | 0,07  | 0,07  | 0,03  | 0,05  | 0,02  | 0,03  | 0,03  | 0,07  | 0,05  |  |

## Kapitola 5

### Diskuze

K zodpovězení otázek týkajících se genetické variability populací rákosu obecného a rozložení genetické diverzity jsem použila molekulární techniky. Podobnost mezi populacemi je dána celou řadou faktorů, mimo jiné i šířením (dále především genetickým driftem, způsobem rozmnožování atd.). Molekulární techniky představují nepřímou metodu odhadu šíření druhu, studují historii šíření za celou dobu existence systému. Výsledky tak neukazují pouze současný stav, ale i jeho vývoj (Avisé, 2000; Ouburg et al., 1999).

Problémem těchto technik často bývá nedostatečné rozlišení použitého molekulárního markeru. V případě mých dat a mikrosatelitových markerů ukazuje analýza molekulární variance (AMOVA) variabilitu v rámci populace 19,8 % a mezi populacemi 80 %, což jsou hodnoty potvrzující dostatečné rozlišení mikrosatelitových markerů. Toto rozdělení genetické variability – nižší uvnitř populací, vysoké mezi populacemi – odpovídá i závěrům Santamaría (2002) pro vodní rostliny. Pravděpodobně je to díky dlouhodobě žijícím klonům, se kterými se u vodních rostlin, rákos nevyjímaje, setkáváme. Důvodem ke klonálnímu růstu je zlepšení přežití populace na daném místě, pro které je klon nejlépe přizpůsoben. Naopak na větší vzdálenosti je výhodnější se šířit variabilnějšími generativními diasporami, u kterých je větší šance na genotyp přizpůsobený jinému prostředí (Clausen et al., 2002; Santamaría, 2002).

### 5.1 Klonální struktura populací

Z celkového množství 202 jedinců bylo nalezeno 101 různých genotypů a z 60 populací bylo 32 populací označeno za monoklonální na základě analýzy programu AFLPdat. Analýza primárních dat byla v některých případech komplikovaná, některé lokusy nebyly zcela čitelné a i po úpravě směsi pro automatický sekvenátor mohlo dojít k mylnému určení délky alely. Možnou chybu ve skórování při zpracování primárních dat jsem snížila opakovanou kontrolou jednotlivých lokusů a definicí klonů jako jedinců lišících se o maximálně dvě alely. K tomuto číslu jsem dospěla na základě analýzy programu AFLPdat, kde páry jedinců lišící se o žádnou, jednu a dvě alely nespádaly do Gaussovského rozdělení v rámci zobrazení četnosti párů lišících se o  $x$  alel na obr. 4.2 str.



35. Připuštění chyby skórování, přestože snižuje rozlišení markeru, zpřesnilo odhad míry klonality například v práci Schnittler et Eusemann (2010).

Drtivá většina monoklonálních populací je z řek - z celkových 44 říčních populací je jich 30 monoklonálních. Z 16 populací rybníků byly monoklonální pouze dvě (populace z Jordánu a Lomského rybníka).

Velký počet monoklonálních populací v rámci malých porostů (14 populací z řek z celkových 18 malých říčních populací) potvrzuje důležitost klonálního růstu na prostorové škále v jednotkách metrů (Hart et Cox, 1995; Barrat-Segretain, 1996; Fér et Hroudová, 2008). Za převahu klonálního růstu na malých škálách může být zodpovědné například nejlepší přizpůsobení daného klonu mikrohabitatu (Santamaría, 2002). U řek jsou malé populace časté a poměr polyklonalita vs. monoklonalita u těchto populací je 4:14.

U rybníků byl proveden sběr malé populace o velikosti 15m pouze jednou (z celkových 16 populací), na Opatovickém rybníku u Hradce Králové, a tato populace je polyklonální, což odpovídá polyklonalitě rybníčních populací. Vysvětlením může být otevřené prostranství kolem celé plochy rybníka s ideálními podmínkami pro klíčení semen (pozvolný bahnitý břeh bez vysoké trávy) a několik dalších populací rákosu ve vzdálenostech do 5 km. Genetická variabilita rybníčních populací může být dána i stářím rybníku, kdy mladší rybníky jsou geneticky více variabilní (Čurn et al., 2007). Dvě monoklonální populace byly nalezeny u Lomského rybníka a rybníka Jordán. Stáří Lomského rybníka se mi nepodařilo dohledat, rybník Jordán byl založen r. 1492 a vysoká míra klonálního růstu by mohla mít původ právě v jeho stáří (Čurn et al., 2007).

Pro velké porosty na březích řek (tedy nad 30 m) po odečtení malých říčních populací (s 2 a 3 analyzovanými vzorky, 14 populací) zůstává 16 monoklonálních populací. U těchto populací mohlo dojít k výskytu jednoho klonu dvěma způsoby. V případě staré populace mohlo dojít k odeznění fáze šíření a ustalování populace a došlo k vyselektování nejlépe přizpůsobeného klonu ve stacionární fázi (Koppitz et Köhl, 2000). Druhým způsobem k vytvoření velké monoklonální populace je tzv. founder effect - jednorázový přísun diaspory, která se v daném habitatu uchytila a postupem času rozrostla na úkor okolní vegetace. K této možnosti se přikláním spíše, vzhledem k četnosti disturbancí jako jsou povodně nebo lidské zásahy do ekosystému, které otvírají „okna“ pro přísun nových klonů do systému (Eriksson, 1997; Clevering, 1999).

Odhalení míry klonality pro jakýkoliv vodní druh je problematické. Dříve se usuzovalo na vysokou míru klonálního růstu (Santamaría, 2002), dnešní studie

se přiklání spíše k nízké, pravděpodobně díky pokroku v rozlišovacích schopnostech molekulárních markerů. Některé studie prokázaly, že i v rámci druhu se může míra klonality lišit v závislosti na prostředí, ve kterém druh roste (Sosnova et al., 2011, Pollux et al., 2007), nebo na stáří populace (Čurn et al., 2007; Křiváčková-Suchá, 2007), čemuž odpovídají i moje data.

Například u druhu *Eichhornia crassipes* zjistili Ren et al. (2005) vysokou míru klonality a nízkou diferenciaci v rámci i mezi populacemi u čínských vzorků, přičemž argumentovali vysokou mírou klonálního růstu a nezáměrným šířením druhu člověkem; v pozdější práci (Ren et Zhang, 2007) objevili v dalších populacích větší množství klonů a tím vyvrátili původní tezi monoklonálního růstu druhu *Eichhornia*, přičemž uvažovali o vlivu disturbancí a říčního proudu (v říčních populacích byla menší míra klonality). Závislost míry klonality na rychlosti říčního proudu prokázal i Pollux et al., (2007) u druhu *Sparganium emersum*. Pro druh *Dryas octopetala* v Norsku byla prokázána klesající genetická diverzita s rostoucí zeměpisnou šířkou (Vik et al., 2010). U vodního druhu *Potamogeton coloratus* dochází ke zvýšení genetické diverzity v dolních částech toků (Gornall et al., 1998), u druhu *Nuphar lutea* a *Sparganium emersum* také (Fér et Hroudová, 2008).

Několikrát byla prokázána i závislost míry klonální diverzity na stáří populace u druhu *Phragmites australis* (Čurn et al., 2007; Kühl et Neuhaus, 1993; Koppitz et Kühl, 2000). Engloner et Major (2011) prokázali na základě analýz mikrosatelitových markerů a RAPD závislost klonální diverzity populací *Phragmites australis* na hloubce vody u velké rybníční populace, to samé odhalili White et al. (2004) v deltě řeky Mississippi, kde se ke gradientu hloubky vody ještě přidává kvalita substrátu.

Na základě dat z analýz programu AFLPdat a vlastních pozorování při sběru vzorků v terénu usuzuji na převahu monoklonálního růstu u říčních populací, způsobenou především formováním nové říční populace pouze jednou úspěšnou diasporou, která obsadila mikrohabitat a rozrostla se (tzv. founder effect). Druh *Phragmites australis* patří mezi alelopatické rostliny, tj. rostliny, které do svého okolí vypouštějí chemické látky narušující kořenový systém okolních rostlin a zabraňující vyklíčení semen v porostu (Rudrappa et al., 2007), což zcela jistě také hraje roli při zachování monoklonality porostu. Polyklonální říční populace nejspíše vznikají při větších disturbancích, při povodních nebo zásazích člověka do profilu břehu (popř. stávající rákosové populace), kdy se otevírá širší „okno“ pro přísun a především úspěšné uchycení a růst diaspor a dochází k růstu několika genet vedle sebe (Eriksson, 1997; Clevering, 1999).

Oproti tomu ekosystém břehů rybníků poskytuje větší prostor pro uchycení nové populace prostřednictvím semen a proto je v rybnících pravděpodobnější výskyt polyklonální populace. I struktura rybníčních břehů (pozdvolnější přechod mezi vodní hladinou a zapojeným porostem břehu), kolísání hladiny a letnění rybníků, kdy dochází k odhalení břehů bez porostu a ideálního místa pro klíčení semen rákosu, nabízí dobré podmínky pro kolonizaci a širší spektrum mikrohabitatů pro různé klony (Engloner, 2011).

Zvýšenou míru polyklonálních populací u rybníčních lokalit potvrzuje i analýza molekulární variance, kdy AMOVA rybníčních populací vykazuje míru variability mezi jedinci v rámci populace 39,9 %, kdežto AMOVA říčních populací udává míru variability mezi jedinci v rámci populace pouze 10,7 %.

## **5.2 Vztahy mezi populacemi**

### **5.2.1 Genetická diferenciací jednotlivých populací a oblastí**

Pro odhad genetické podobnosti byla z důvodu binárního skórování alel použita  $F_{ST}$ -like AMOVA, která hodnotí každou rozdílnou alelu bez ohledu na míru rozdílnosti v délkách. Pro matici všech populací vyšla variabilita v rámci populace 19,8 % a mezi populacemi 80,2 %. Zásadní rozdíl je u analýz datové matice říčních populací a datové matice rybníčních populací. U řek vyšlo v rámci populace 10,7 % variability, kdežto u rybníků 39,9 %, u rybníků je tedy daleko větší míra variability mezi jedinci v rámci jedné populace a populace jsou tvořeny z více rozdílných jedinců, než u řek. Variabilita mezi populacemi vyšla ve všech maticích vysoká – pro všechny druhy 80,2 %, pro řeky 81,8 %, pro rybníky 60,1 %, je důkazem velkých rozdílů mezi jednotlivými populacemi. U všech provedených analýz molekulární variance vyšel vysoký i fixační index  $F_{ST}$ , což ukazuje na vysoký stupeň izolovanosti jednotlivých populací. U datových matic, kde byly populace rozděleny do jednotlivých skupin (tedy matice říčních populací a matice z vybraných geografických oblastí, viz dodatek A.1, A.2, A.3 str. 90), byla variability mezi těmito skupinami pouze 7,5 % (u řek) a 5,2 % (u oblastí). To ukazuje, že geografické umístění populací nemá na genetickou variabilitu výrazný vliv a nejvyšší procento vysvětlené variability zůstává na úrovni mezipopulační, což je běžné u druhů, které se velmi snadno šíří větrem na větší vzdálenosti a nejsou tak závislé například na vektoru říčního proudu. Ke stejnému výsledku došel u *Phragmites australis* i Fér et Hroudová (2009), u *Typha latifolia* Fér et al. (2007).

Bayesovské shlukování pomocí programu BAPS 3.2 rozdělilo původních 101 jedinců (tedy datová matice neobsahující klony) z 60 populací do 21 shluků. Zřetelně se oddělila populace z Jihlavy a Ohře, ostatní rozdělení už nevykazuje rysy odkazující na geografické oblasti, společné shluky nevytvořily populace z Moravy ani Dyje. V několika clusterech došlo k shluknutí vždy několika populací z dané oblasti. To můžeme označit jako důkaz komunikace mezi jednotlivými populacemi - dálkové šíření semen nejčastěji za pomoci větru. V případech shluknutí jedinců z velmi vzdálených lokalit se může jednat o neschopnost programu BAPS najít v datovém souboru jasnou strukturu, která tam sice je, ale je velmi slabá, můžeme ji vidět ve výstupech programu FAMD – tedy stromu a analýze PCoA. Čím víc se blíží počet clusterů počtu jedinců, tím jsou výsledky hůře interpretovatelné.

Podobné rozdělení populací nabízí i analýza fylogenetické příbuznosti programem FAMD metodou UPGMA a analýza PCoA. Zejména ve výstupu analýzy fylogenetické příbuznosti je struktura jasněji patrná, zřetelněji se oddělují populace Dyje (ve stromu i trojrozměrném grafu), je jasněji viditelné shluknutí některých populací ze stejných oblastí (v rámci všech datových matic). Samostatně se shlukují některé populace oblasti Labe a Orlice, Sázavy i Lužnice. Dochází k jasnému oddělení populace z Jihlavy a Labského kanálu.

Do některých shluků na základě Bayesovského clusterování byly u datové matice říčních populací přiřazeny pouze populace z jedné řeky. U těchto populací můžeme říci, že došlo k šíření pouze v rámci říčního koridoru. Stejně výsledky byly uveřejněny pro *Oryza glumaepatula* (Akimoto et al., 1998), *Vallisneria spinulosa* (Chen et al., 2007), u *Phragmites australis* byly nalezeny shluky v rámci jedné řeky v práci Fér et Hroudová (2009). Některé clustery jsou tvořeny pouze jednou populací, která byla natolik odlišná, že nebyla nikam jinam přiřazena. Tyto genotypy mohou představovat zbytek kdysi více rozšířené skupiny, která nebyla dostatečně odolná a byla redukována selekčními tlaky měnícího se prostředí, nebo naopak genotyp, který se dostal na lokalitu nedávno a bude se šířit teprve v budoucnu (Fér et Hroudová, 2009).

Program Structure rozdělil populace do 5 nebo 4 shluků (z 10 možných). Toto omezení počtu shluků mělo za následek nerozhodnost přiřazení u některých jedinců. V případě 5 shluků se velmi dobře oddělily 4 populace ze Sázavy, k nimž se přidala rybníční populace Českého středohoří. Také se dobře oddělily 4 populace z oblasti Hradce Králové. Další shluky už jsou tvořeny několika geografickými celky, populace Ohře, které se dobře oddělily v případě analýz programů BAPS 3.2 a FAMD, zde nebyly jednoznačně

odděleny, ale jsou všechny přiřazeny do jednoho shluku. Při rozdělení populací do 4 shluků dochází k redukci diferenciace na začátku a úplném konci grafu. Opět se tu oddělilo několik populací Sázavy s rybníkem z Českého Středoohoří a některé populace kolem Hradce Králové. Dva velké shluky jsou tvořeny nejrozličnějšími populacemi z různých částí republiky. Přestože dochází v jednotlivých oblastech k převaze vždy nějakého shluku, nelze říci, že by byly vzorky z různých oblastí jasně geograficky oddělené.

Populace na základě výše zmíněných analýz tedy vykazují určitou příbuznost, zejména v rámci geografických oblastí. Do společných shluků byli přiřazeni jedinci z lokalit nespojených tekoucí vodou, proto je třeba předpokládat šíření diaspor mezi říčními systémy i rybníčními lokalitami. K tomu může docházet větrem, ptáky nebo lidskou činností. Populace mezi sebou komunikují, více na menší vzdálenost, i nezávisle na koridoru řeky, komunikace na velké vzdálenosti je sice také patrná, ale vzhledem k velkým úsekům bez sběru vzorků a nevyváženosti frekvence alel si jí nemůžeme být stoprocentně jisti. Pro tento druh transportu je tedy pravděpodobnější generativní šíření a jednotlivé oblasti nejsou stoprocentně izolované. Ke stejnému závěru u druhu *Phragmites australis* došli i Fér et Hroudová (2009), kteří prováděli podobné analýzy na menším území v rámci toku Cidliny, Mrliny a části Labe.

Důkazem vegetativního šíření mezi populacemi je nalezení identického genotypu v různých populacích. V rámci mých dat byli identičtí jedinci nalezeni mezi populacemi 51 a 54 z Hradce Králové, které rostly ve vzdálenosti zhruba 100 m a mezi populacemi 27 a 28 ze Sázavy vzdálených 11 km. Tyto události odpovídají zjištění z Fér (2009), kdy na území Cidliny a Mrliny bylo prokázáno vegetativní šíření úlomky genet na vzdálenost 0,5 až 10,8 km. Dálkové vegetativní šíření bylo zjištěno například u druhů *Typha minima* na řece Rýn (Galeuchet et al., 2002), *Vallisneria spirulosa* na řece Yangtze v Číně (Chen et al., 2007), *Bistorta vivipara* ve Švédsku (Lundquist et Andersson, 2001).

Vegetativní šíření bylo zjištěno i mezi jedinci z populací 25 ze Sázavy a 42 z Vltavy v Praze, kteří jsou vzdálení 56 km, ale v tomto případě je rozdíl v genotypu jedinců 2 alely, což je počet, který byl v rámci populace považován za klony, ale v případě jedinců z takto vzdálených populací je možné, že se opravdu jednalo o blízké příbuzné rozdílné genety. Je ale také možné, že sem tento klon byl zavlečen člověkem, neboť se lokalita vyskytovala blízko cvičného kanálu pro kanoisty a kajakáře a vegetativní diaspora se sem mohla dostat s vybavením.

Současné rozmístění genetické diverzity a šíření rákosu ale není jen otázkou řek a šíření větrem nebo živočichy. Z velké části se na něm začíná projevovat nový fenomén

dálnic a silnic, podél kterých se s rákosovými populacemi setkáváme stále více. Jodoin et al. (2008) studoval šíření rákosu podél dálnic v Kanadě. Silnice vytvářejí síť lineárních mokřin ideálních pro šíření druhu do dalších lokalit, odkud může docházet k šíření větrem nebo zvířaty do vzdálenějších mokřin a jejich kolonizaci, v případě Kanady a Ameriky invazi. Tento fenomén jsem ve své práci nepostihla, ačkoliv jsou populace v příkopech možná běžnější, než populace na březích řek, kde populace mizí s úpravami břehů řek. Pro odhalení vztahů mezi populacemi ze stojatých vod, proudících vod a vlhkých nepobřežních stanovišť by bylo potřeba provést sběr vzorků ze všech populací co největšího území a následně srovnat počet přenosů v rámci řeky, v rámci silničního koridoru a mezi populacemi nijak nespojenými (u kterých došlo k přenosu větrem/zvířaty).

### 5.2.2 Geografická vzdálenost a genetická podobnost

Rákos obecný vykazuje genetickou izolaci geografickou vzdáleností (isolation by distance), prostorově bližší populace jsou si geneticky podobnější. Jedinci jsou pozitivně autokorelovaní do vzdálenosti zhruba 2 km, což je o něco méně než zjistili Fér et Hroudová (2009), menší zjištěná vzdálenost je nejspíše dána nižší hustotou sběru dat a malým počtem dvojic v nižších distančních třídách.

Izolace geografickou vzdáleností může mít původ v intenzivním genovém toku mezi geograficky blízkými populacemi, ať už prostřednictvím semen nebo pylu, a v redukovaném genovém toku na dlouhé vzdálenosti (především semeny). V případě absence šíření na velké vzdálenosti by měl výsledný graf stabilně klesající charakter (Hardy et Vekemans, 1999), v případě všech mých datových matic ale došlo k mírnému (ale nesignifikantnímu) nárůstu prostorové autokorelace na velkých vzdálenostech, proto předpokládám i jistou míru šíření na velké vzdálenosti, které je usnadněno jeho adaptací k anemochorii (Rodewald-Rudescu, 1974). Značné šíření na velké vzdálenosti zaznamenal i Lambertini et al. (2008). Výskyt jisté míry šíření na velké vzdálenosti je potvrzen i Bayesovským shlukováním, které k sobě do shluků přiřadilo vzdálené populace.

Možným dalším faktorem umožňujícím šíření na velké vzdálenosti, je transport rostlinných propagulí vodními ptáky. Figuerola et Green (2002) konstatovali širokou dokumentaci ornitochorie, ale chybějící informace o vlastnostech transportovaných propagulí. Vzhledem k charakteru semen druhu *Phragmites australis* je možné, že dochází k zachycení na tělech ptáků (exozoochorii) a jejich přenosu na větší vzdálenosti, ale

je prakticky nemožné odhalit sílu a významnost tohoto přenosu, vzhledem k významnému podílu anemochornímu šíření.

Genetická izolovanost geografickou vzdáleností (isolation by distance) je u různých druhů rostlin různě zastoupena. Poměrně běžná je např. u *Zostera marina* (Olsen et al., 2004), *Posidonia oceanica* (Arnaud-Haond et al., 2007), *Senecio rodriguezii* (Molins et al., 2009), *Hypericum nummularium* (Guadeul, 2006), *Arabidopsis thaliana* (Sharbel et al., 2000) atd. Naopak nebyla potvrzena např. u *Iris aphylla* (Wroblewska et Brzosko, 2006), *Trillium erectum* (Griffin et Barrett, 2004). Ohledně genetické izolovanosti geografickou vzdáleností nelze pro rostliny učinit jednoznačný závěr, studované druhy i jejich prostředí jsou velmi variabilní.

## Kapitola 6

### Závěr

Pomocí mikrosatelitové analýzy 202 jedinců ze 60 populací rákosu obecného byly zodpovězeny otázky týkající se genetické variability populací a interpretace rozložení genetické diverzity rákosu obecného v rámci České republiky (str. 9) Mikrosatelitové lokusy byly dostatečně variabilní, aby prezentované závěry byly podloženy.

1. *Phragmites australis* tvoří jak monoklonální, tak polyklonální porosty. Míra klonality závisí na prostředí, ve kterém se populace nachází. Říční populace častěji tvoří monoklonální populace, nejspíše z důvodu tzv. founder effectu, polyklonální porosty vznikají pravděpodobně po větších disturbancích. Rybníční populace jsou častěji polyklonální, nejspíše díky vhodnějšímu prostředí pro klíčení semen.

2. Jednotlivé populace vykazují vysoký stupeň izolovanosti podle statistiky  $F_{ST}$ , příslušnost k jednotlivým geografickým oblastem vysvětlila jen malou míru variability, nejvyšší procento vysvětlené variability zůstává na úrovni mezipopulační, což je u druhů lehce šířitelných větrem běžné. Z datového souboru se na základě Bayesovského shlukování, Neighbour joining metody i analýzy PCoA jasněji vyčlenily pouze populace Ohře, ostatní geografické oblasti nebyly jasně odděleny, dochází mezi nimi k výměně genetického materiálu.

3. Mezi populacemi byly nalezeny důkazy vegetativního šíření na kratší vzdálenost (do 11 km). Ke generativnímu šíření dochází častěji, populace mezi sebou komunikují, více na menší vzdálenosti, ale bylo potvrzeno generativní šíření i mezi jednotlivými řekami nebo dokonce oblastmi. Šíření na velké vzdálenosti je pravděpodobně zprostředkováno větrem, nemůžeme ale vyloučit ani vliv vodních ptáků nebo člověka.

4. Říční a rybníční populace se od sebe liší v míře klonálního růstu. Populace z řek jsou častěji monoklonální, pravděpodobně díky způsobu formování nových populací na březích jednou úspěšnou diasporou (tzv. founder effect) a alelopatii druhu. Polyklonální říční populace vznikají nejspíše při větších disturbancích při otevření širšího prostoru pro přísun a uchycení diaspor. Rybníční populace jsou častěji polyklonální, ekosystém rybníka



poskytuje větší prostor k uchycení semen a jejich vyklíčení. Také charakter břehu může poskytovat širší spektrum mikrohabitatů vhodné pro různé klony.

5. Rákos obecný vykazuje genetickou izolovanost geografickou vzdáleností (isolation by distance), prostorově bližší populace jsou si podobnější. Pozitivní autokorelace je detekovatelná do vzdálenosti cca 2 km.

## Literatura

Agarwal M., Shrivastava N. et Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their application in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, 27, 617-631.

Akimoto M., Shimamoto Y. et Morishima H. (1998): Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. *Molecular Ecology*, 7, 1371-1381.

Andersson E., Nilsson C. et Johansson M. E. (2000): Plant dispersal in boreal rivers and its relation to the diversity of riparian flora. *Journal of Biogeography*, 27, 1095-1106.

Araki S. et Kunii H. (2006): Allozymic implications of the propagation of eelgrass *Zostera japonica* within a river system. *Limnology*, 7, 15-21.

Armstrong J., Afreen-Zobayed F., Blyth S. et Armstrong W. (1999): *Phragmites australis*: effects of shoot submergence on seedling growth and survival and radial oxygen loss from roots. *Aquatic Botany*, 64, 275-289.

Arnaud-Haond S., Duarte C. M., Alberto F. et Serrao E. A. (2007): Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16, 5115-5139.

Avice J. C. (1998): The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371-379.

Avice J. C. (2000): *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer Associates, 2 edition.

Baker A. J. (2000): *Molecular methods in ecology*. Blackwell publishing.

Barrat-Segretain M.-H. (1996): Germination and colonisation dynamics of *Nuphar lutea* in a former river channel. *Aquatic botany*, 55, 31-38.

Barrett S.C.H, Eckert C. G. Et Husband B. C (1993): Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany*, 44, 105-145.

Begon M., Harper J. L. et Townsend C. R. (1997): *Ekologie: jedinci, populace a společenstva*. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc.

Becher S. A., Steinmety K., Weising K., Bourz S., Peltier D., Renou J.-P., Kahl G. et Wolff K. (2000): Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 643-651.

Björk S. (1967): Ecologic investigations of *Phragmites communis*. *Studies in theoretic and applied limnology. Folia Limnol. Scand.*, 14, 1-248.

Boedeltje G., Bakker J. P., Ten Brinke A., Van Groenendael J. M. et Soesbergen M. (2004): Dispersal phenology of hydrochorous plants in relation to discharge, seed release time and buoyancy of seeds: the flood pulse concept supported. *Journal Ecology*, 92, 786-796.

Briggs D. et Walters S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Cambridge University Press.

Brown J. H. et Kodric-Brown A. (1977): Turnover rates in insular biogeography - effects of immigration on extinction. *Ecology*, 58, 2, 445-449.

Brown J. H. et Lomolino M. V. (1998): *Biogeography*, 2nd edition, chapter History of Biogeography, 13-35. Sinauer Associates.

Bullock J. M. et Clarke R. T. (2000): Long distance seed dispersal by wind: measuring and modelling the tail of the curve. *Oecologia*, 124, 4, 506-521.

Burkart M. (2001): River Corridors Plants (Stromtpflanzen) in Central European Lowland: a review of a poorly understood plant distribution pattern. *Global Ecology and Biogeography*, 10, 449-468.

- Cain M. L., Damman H. et Muir A. (1998): Seed dispersal and the holocene migration of woodland herbs. *Ecological monographs*, 68, 325-347.
- Callaway R. M., Deluca T. H. et Belliweaut W. M. (1999): Biological-control herbivores may increase competitive ability of the noxious weed *Centaurea maculosa*. *Ecology* 80, 1196-1201.
- Casper S.J. et Krausch H. D. (1981): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 24. Pteridophyta und Anthophyta, 2.Teil. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Clausen P., Nolet B. A., Fox A. D. et Klaassen M. (2002): Long-distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe - a critical review of possibilities and limitations. *Acta Oecologica*, 23, 191-203.
- Clevering O. A. et Lissner J. (1999): Taxonomy, chromosome numbers, clonal diversity and population dynamics of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 64, 185-208.
- Comes H. P. et Kadereit J. W. (1998): The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in plant science*, 3(11),432-438.
- Corander J. et Marttinen P. (2005): BAPS: Bayesian analysis of population structure. Manual v.3.1 University of Helsinki, Finland. Available at <http://web.abo.fi/fak/mnf//mate/jz/software/baps.html>.
- Cummins K. W., Wilzbach M. A., Gates D. M., Perry J. B. et Taliaferro W. B. (1989): Shredders in riparian vegetation. *Bioscience*, 39, 24-30.
- Čurn V., Kubátová B., Vávřová P., Křiváčková-Suchá O. et Čížková H. (2007): Phenotypic and genotypic variation of *phragmites australis*: Comparison of populations in two human-made lakes of different age and history. *Aquatic Botany*, 86, 321-330.
- Danvind M. et Nilsson C. (1997): Seed floating ability and distribution of alpine plants along a northern Swedish river. *Journal of Vegetation Science*, 8,271-276.

Douhovnikoss V. et Dodd R. S. (2003): Intra-clonal variation and a similarity treshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers. *Theoretical Applied Genetics*, 106, 1307-1315.

Doyle J. J. et Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 40, 117.

Eavno G., Regnaut S. et goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.

Ehrich D. (2006) AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Mol. Ecol. Notes*, 6, 603-604.

Ehrich D., Gaudeul M., Assefa A., Koch M., Mummenhoff K. et Nemomissa S. (2007): Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic , the Alps anf the East African mountains. *Molecular Ecology*, 16, 2542-2559.

Ellstrand, NC. C. et Roose, M.L. (1987): Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American journal of borany*, 74, 123-131

Engloner A. I. et Major A. (2011): Clonal diversity of *Phragmites australis* propagating along water depth gradient. *Aquatic Botany*, 94, 4, 172-176.

Eriksson O. (1992): Evolution of seed dispersal and recruitment in clonal plants. *Oikos* 63, 439-448.

Eriksson O. (1997): Clonal life histories and evolution of seed. In: De Kroon H., Van Groenandel J.: *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Backhuys Publication, Leiden, 185-210.

Excoffier L., Laval G., et Schneider S. (2006): ARLEQUIN Version 3.01 An integrated software package for population genetics. Technical report, Univerzita Bern.

Excoffier L., Smouse P. et Quattro J. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

Falush D., Steohens M. et Pritchard J.K. (2003): Inference of population structure: Extensions to linked loci correlated allel frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

Falush D., Stephens N. et Pritchard J. K. (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.

Fér T. (2000): Vztah parametrů generativního šíření vodních rostlin k jejich skutečnému rozšíření podle vodního toku. Master thesis. Katedra botaniky PřF UK v Praze, Benátská 2, 128 01, Praha 2.

Fér T. (2008): Study of plant dispersal in river corridors using molecular markers. PhD thesis, Charles university Prague, Faculty of Science, Department of Botany, Benátská 2, Praha 2, 12801.

Fér T. et Hroudová Z. (2008): Detecting dispersal of *Nuphar lutea* in river corridors using microsatellite markers. *Freshwater biology*, 53 (7), 1409-1422.

Fér T. et Hroudová Z. (2008): Genetic diversity and dispersal of *Phragmites australis* in a small river system. Study of plant dispersal in river corridors using molecular markers. 75-94, Department of botany, Charles University in Prague [Ph.D. Thesis]

Figuerola J. et Green A.J. (2002): Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47, 483-494.

Figuerola J., Santamaría L., Green A.J., Luque I., Alvarez R. et Chharalambidou I. (2005): Endozoochorous dispersal of aquatic plants: Does seed gut passage affect plant performance? *American Journal of Botany*, 92 (4), 696-699.

- Fischer M., Husi R., Prati D., Peintinger M., van Kleunen M. et Schmid B. (2000): RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 87 (8), 1128-1137.
- Galeuchet D. J., Holderegger R., Rutishauser R. et Schneller J. J. (2002): Isozyme diversity and reproduction of *Typha minima* populations on the upper River Rhine. *Aquatic Botany*, 74, 19-32.
- Gaudeul M. (2006): Disjunct distribution of *Hypericum nummularium* L. (Hypericaceae): molecular data suggest bidirectional colonization from a single refugium rather than survival in distinct refugia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(3), 437-447.
- Gorenflot R., Sanei-Chariat Panahi et Liebert J. (1979): Le complexe polyploïde du *Phragmites australis* (cav.) Trin ex Steud. En Iran. *Rev. Cytol. Biol. Végét., Bot.* 2, 67-81.
- Gorenflot R., Tahiri H. et Lavabre P. (1990): Anomalies méitotiques de la microsporogénèse dans un complex polyploïde: *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud. *Rev. Cytol. Biol. Végét., Bot.* 13, 153-172.
- Gornall R. J., Hollingsworth P. M. et Preston C. D. (1998): Evidence for spatial structure and directional gene flow in population of an aquatic plant, *Potamogeton coloratus*. *Heredity*, 80, 414-421.
- Grant V. (1981): *Plant speciation*. New York, USA: Columbia University Press.
- Green A.J., Figueroa J. et Sánchez M.I. (2002): Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23, 177-189.
- Griffin S. R. et Barrett S. C. H. (2004): Genetic variation in *Trillium erectum* (Melanthiaceae), a widespread forest herb in eastern North America. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 82(3), 316-321.

Hansen D. L., Lambertini C., Jampeetong A. et Brix, H. (2006): Clone-specific difference in *Phragmites australis*: Effects of ploidy level and geographic origin. *Aquatic Botany*, 86, 269-279.

Hardy O.J. (2003): Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology*, 12, 1577-1588.

Hardy O.J. et Vekemans X. (1999): Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* 83, 145-154.

Hardy O.J. et Vekemans X. (2002): SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual od population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618-620.

Hart K.H. et Cox P.A.(1995): Dispersal ecology of *Nuphar luteum*(L.) Sibthorp and Smith: abiotic seed dispersal mechanisms. - *Botanical Journal Linn. Soc.* 119, 87-100.

Hartl D. L. et Clark A. G. (1997): *Principles of population genetics*, 3rd edition, Sinauer, USA.

Haslam S. (1969): Stem types of *Phragmites communis* Trin., *Ann.Bot.* 33, 127-131.

Haslam S. (1969): The development and emergence of buds in *Phragmites communis* Trin., *Ann. Bot.*33, 289-301.

Haslam S. (1969): The development of shoots in *Phragmites communis* Trin., *Ann. Bot.* 33, 695-709.

Haslam S. (1970): The development of the annaul population in *Phragmites communis* Trin., *Ann. Bot.* 34, 571-591.



- Haslam S. (1970): The performance of *Phragmites communis* Trin. In relation to water-supply. *Ann. Bot.* 34, 867-877.
- Haslam S. (1972): Biological flora of the British Isles. *Phragmites communis* Trin., *Journal Ecology*, 60, 585-610.
- Hejný S. (1960): Ökologische Charakteristik der Wasser- und Sumpfpflanzen in der slowakischen Tiefebene (Donau- und Theissgebiet). SAV, Bratislava.
- Hennig W. (1999): *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press.
- Honnay O. et Bossuyt B. (2005): Prolonged clonal growth: escape route or route of extinction? *Oikos*, 108, 427-432.
- Chen L., Xu L. et Hunag H. (2007): Genetic diversity and population structure in *Vallisneria spirulosa* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 86, 46-52.
- Jacobs M. J. et Macisaac H. J. (2009): Modelling spread of the invasive macrophyte *Cabomba*. *Freshwater Biology*, 54, 296-305.
- Jansson R., Zinko U., Merritt D.M. et Nilsson C. (2005): Hydrochory increases riparian plant species richness: a comparison between a free-flowing and regulated river. *Journal of Ecology*, 93, 1094-1103.
- Jodoin Y., Lavoie C., Villeneuve P., Theriault M., Beaulieu J et Belzile F. (2008): Highways as corridors and habitats for the invasive common reed *Phragmites australis* in Quebec, Canada. *Journal of Ecology*, 45, 459-466.
- Johansson M. E., Nilsson Ch. et Nilsson, E. (1996): Do rivers function as corridors for plant dispersal? *Journal of Vegetation Science*, 7, 593-598.
- Keller, B. E. M. (2000): Genetic variation among and within populations of *Phragmites australis* in the Charles River watershed. *Aquatic Botany*, 66, 195-208.

Kihara H. et Ono T. (1926): Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex - Arten. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, 4, 475-481.

Kimura M. et Weiss G.H. (1964): The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. Genetics, 49(4), 561-576.

Klekowski E.J. (2003): Plant clonality, mutation, diplontic selection and mutational meltdown. Biological Journal of the Linnean Society, 79, 61-67.

Komárek S. (1997): dějiny biologického myšlení. Vesmír, Praha, Medúza edition.

Koppitz H. et Kühl H. (2000): To the importance of genetic diversity of Phragmites australis in the development of reed stands. Wetland Ecology Management, 8, 403-414.

Koppitz H., Kühl H., Hesse K et Kohl J.-G. (1997): Some aspects of the importance of genetic diversity of Phragmites australis (Cav.) Trin. Ex Steudel for the development of reed stands. Botanica Acta 110, 217-223.

Křiváčková-Suchá O., Vávřová P., Čížková H., Čurn V. et Kubátová B. (2007): Phenotypic and genotypic variation of Phragmites australis: A comparative study of clones originating from two populations of different age. Aquatic Botany, 86, 361-368.

Kudoh H. et Whigham D. (1997): Microgeographic genetic structure and gene flow in Hibiscus moscheutos (Malvaceae) populations. American Journal of Botany, 84(9), 1285-1285.

Kühl H. et Neuhaus D. (1993): The genetic variability of Phragmites australis investigated by random amplified polymorphic DNA. In: Ostendorp W., Krumscheid-Plankert P., Seeuferzerstörung und Seeuferrenaturierung in Mitteleuropa. Gustav Fischer, Stuttgart, 9-18.

Lamote V., Roldán-Ruiz I., Coart E., De Loose M. et van Bockstaele E. (2002): A study of genetic variation in Iris pseudacorus populations using amplified length polymorphism (AFLPs). Aquatic Botany, 73, 19-31.

Les D. H., Crawford D. J., Kimball R. T., Moody M. L. et Landolt E. (2003): Biogeography of Discontinuously Distributed Hydrophytes: A Molecular Appraisal of Intercontinental Disjunction. *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 917-932.

Li W., Xia L. Q., Li J. Q. et Wang G. X. (2004): Genetic diversity of *Potamogeton maackianus* in the Yangtze River. *Aquatic Botany*, 80, 227-240.

Liu Y. F., Wang Y. et Huang H. W. (2006): High interpopulation genetic differentiation and unidirectional linear migration patterns in *Myricaria laxiora* (Tamaricaceae), an endemic riparian plant in the Three Gorges Valley of the Yangtze River. *American Journal of Botany*.

Loxdale H. D. et Lushai G. (2003): Rapid changes in clonal lines: the death of a 'sacred cow'. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79, 3-16.

Lundin, L. G. (1993): Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosome regions in man and the house mouse. *Genomics*, 16, 1-19.

Lundquist E. et Andersson E. (2001): Genetic diversity in populations of plants with different breeding and dispersal strategies in a free-flowing boreal river system. *Hereditas*, 93, 206-215.

Luther H. (1951): Verbreitung und Ökologie der höheren Wasserpflanzen im Brackwasser der Ekenäs-Gegend in Südfinnland. II. Spezieller Teil. *Acta Botanica Fenn.*, 50, 13-70.

Marks et al. (1993): Element Stewardsjip Abstract for *Phragmites australis*. <http://tncweeds.ucdavis.edu/esadocs/documnts/phraaus.html>

Markwith S. H., Stewart D. J. et Dyer J. L. (2006): Tetrasat: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 6, 586-589.

- Markwith S.H. et Scanlon M. J. (2007): Multiscale analysis of *Hymenocallis coronaria* (Amaryllidaceae) genetic diversity, genetic structure and gene movement under the influence of unidirectional stream flow. *American Journal of Botany*, 94, 151-160.
- McCauley D.E. (1995): The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 10(5), 198-202.
- Metzgar D., Bytof J. et Wills C. (2000): Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.*, 10, 72-80.
- Molins A., Mayol M. et Rossello J. A. (2009): Phylogeographical structure in the coastal species *Senecio rodriguezii* (Asteraceae), a narrowly distributed endemic Mediterranean plant. *Journal of Biogeography*, 36(7), 1372-1383.
- Morton J. K. et Hogg E. H. (1989): Biogeography of island floras in the Great Lakes. II. Plant dispersal. *Canadian Journal of Botany*, 67, 1803-1820.
- Mueller M. H. et van der Valk A. G. (2002): The potential role of ducks in wetland dispersal. *Wetlands*, 22(1), 170-178.
- Müller-Schneider P. et Lhotská M. (1971): Zur Terminologie der Verbreitungsbiologie der Blütenpflanzen. *Folia Geobot. Phytotax.* 6(4), 407-417.
- Nei M., Tajima F. et Tateno Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19, 153-170.
- Neuhaus N., Kühl H, Kohl J.-G., Dörfel P. et Börner T. (1993): Investigations on the genetic diversity of *Phragmites* stands using genomic fingerprinting. *Aquatic Botany*, 45, 357-364.
- Nies G. et Reusch T. B. H. (2005): Evolutionary divergence and possible incipient speciation in post-glacial populations of a cosmopolitan aquatic plant. *J. Biol. Evol.*, 18, 19-26.

Nisson C., Grelsson G., Johansson M. et Sperens U. (1989): Patterns of plant species richness along riverbanks. *Ecology*, 70, 77-84.

Nordborg M., Hu T. T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., et al. (2005): The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*, 3(7),196.74

Olsen J. L., Stam W. T., Coyer J. A., Reusch T. B. H., Billingham M., Bostrom C., Calvert E., Christie H., Granger S., La Lumiere R., Milchakova N., Oudot-LeSecq M. P., Procaccini G., Sanjabi B., Serrao E., Veldsink J., Widdicombe S. et Wyllie-Echeverria S. (2004): North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology*, 13(7),1923-1941.

Ostendorp W., Dienst M. et Schmieder K. (2003): Disturbance and rehabilitation of lakeside *Phragmites* reeds following an extreme flood in Lake Constance (Germany). *Hydrobiologia*, 506-509, 687-695.

Ouborg N. J., Piquot Y. et van Groenendael (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87, 551-568.

Pairon M., Jonard M. et Jacquemart A. L. (2006): Modeling seed dispersal of black cherry, an invasive forest tree: how microsatellites may help? *Canadian Journal of Forest Research*, 36(6),1385-1394.

Pazourková Z. (1973): Caryology of some forms of *Phragmites communis* Trin. PT-PP/IBP Report 3, 59-62.

Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducousso A. et Kremer A. (1997): Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Population Biology*, 94, 9996-10001.

Pollux B. J. A., De Jong M., Steegh A., Verbruggen E., Van Groenendael J. M. et Ouborg N. J. (2007): Reproductive strategy, clonal structure and genetic diversity in populations of the aquatic macrophyte *Sparganium emersum* in river systems. *Molecular Ecology*, 16, 313-325.

Prentis P. J. et Mather P. B. (2008): Fine-scale patterns of genetic variation indicate non-equilibrium gene frequency divergence in the stream lily, *Helmholtzia glaberrima*. *Freshwater Biology*, 53(5),973-980.

Provan J., Powell W. et Hollingsworth P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16(3).

R Development Core Team (2008): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Ren M. X. and Zhang Q. G. (2007): Clonal diversity and structure of the invasive aquatic plant *Eichhornia crassipes* in China. *Aquatic Botany*, 87,242-246.

Ren M. X., Zhang Q. G. et Zhang D. Y. (2005): Random amplified polymorphic DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China. *Weed Research*, 45(3),236-244.

Ridley H.N. (1930): The dispersal of plants throughout the world. L. Reeve et Co., Kent

Rodewald-Rudescu L. (1974): Das Schilfrihr. *Phragmites communis* Trin. Die Binnengewässer Band 27. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

Rosenberg N. A. (2004): Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137-138.

Rudrappa T., Bonsall J., Gallagher J. L., Seliskar D. M. et Bais P. (2007): Root-secreted Allelochemical in the Noxious Weed *Phragmites australis* Deploys a Reactive Oxygen Species Response and Microtubule Assembly Disruption to Execute Rhizotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1898-1918.

Russell J. R., Weber J. C., Booth A., Powell W., Sotelo-Montes C., and Dawson I. K. (1999): Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin,

revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8(2),199.

Rychnovská M. (1978): Water relations, water balance, transpiration and water turnover in selected reedswamp communities. In: Dykyjová D., Květ J., Pond littoral ecosystems, *Ecological Studies* 28. Springer, Berlin, 246-256.

Řičařová V. (2011): Dálkové šíření *Rumex alpinus*. Master thesis, Charles university Prague, Faculty of Science, Department of Botany, Benátská 2, Praha 2, 12801.

Sádlo J., Pokorný O., Hájek P., Dreslerová D. et Cílek V. (2005): Krajina a evoluce: významné přelomy ve vývoji kulturní krajiny českých zemí. Malá skála, Praha

Saltonstall K. (2002): Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *PNAS*, 99, 4, 2445-2449.

Saltonstall K. (2003): Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology*, 12, 1689-1702.

Scribner K. T. et Pearce J. M. (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. Pages 235-273 in A. Baker (ed.), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Ltd., Oxford, U.K.

Shalchian-Tabrizi K., Asmund Skjaeveland, Enger P., Mevik B.-H., Orr R., Kumar S., et al. (2004): The Bioportal at University of Oslo.

Sharbel T. F., Haubold B. et Mitchell-Olds T. (2000): Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology*, 9(12),2109-2118.

Schlötteter C. et Tautz D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acid Res*, 20, 2211-2215.

- Schlütter P. M. et Harris S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology*, 6, 2, 569-572.
- Schneider R.L. et Sharitz R. R. (1988): Hydrochory and regeneration in bald cypress-water tupelo swamp forest. *Ecology*, 69, 1055-1063.
- Schnittler M. et Eusenamm P. (2010): Consequence of genotyping errors for estimation of clonality: a case study on *Populus euphratica* Oliv. (Salicaceae). *Evolution Ecology*, 24, 1417-1432.
- Schonswetter P., Tribsch A. et Niklfeld H. (2004): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) suggests old and recent immigration into the Alps by the arctic-alpine annual *Comastoma tenellum* (Gentianaceae). *Journal of Biogeography*, 31, 1673-1681.
- Sidow A. (1992): Genome duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6, 715-722.
- Silvertown J. (1991): Dorothy's dilemma and the unification of plant population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 346-348.
- Soltis D. E. et Rieseberg L. H. (1986): Autopolyploidy in *Tolmiea Menziesii* (Saxifragaceae): evidence from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany*, 73, 310-318.
- Sosnova M., van Diggelen R., Macek P. et Klimesova J. (2011): Distribution of clonal growth traits among wetland habitats. *Aquatic Botany*, 95, 2, 88-93.
- Sun G.-L., Díaz O., Salomon B. et von Bothmer R. (1999): Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. *Genome*, 42, 420-431.
- Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471.



Thiébaud G. (2007): Invasion succes of non-indigenous aquatic and semi-aquatic plants in their and introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France. *Biological Invasions*, 9, 1-12.

Tribsch A., Schonswetter P. et Stuessy T. F. (2002): *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. *American Journal of Botany*, 89 (12), 2024-2033.

Uchytel R. J. (1992): *Phragmites australis*. In: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fore Sciences Laboratory, Fire Effects Information System, <http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/phraus/all.html>. 19p.

van der Pijl L. (1982): Principles of dispersal in higher plants, third revised and expanded edition. Springer-Verlag.

Vik U., Jorgensen M. H., Kauserud h., Nordal I. et Brysting A. K., (2010): Microsatellite markers show decreasing diversity but unchanged level of clonality in *Dryas octopetala* (Rosaceae) with increasing latitude. *American Journal of Botany*, 97, 6, 988-997.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans, van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M. et Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.

Wanntorp L. et Wanntorp H.-E. (2003): The biogeography of *Gunnera* L.: vicariance and dispersal. *Journal of Biogeography*, 30, 979-987.

Watkinson A. R. et Powell J. C. (1993): Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations - a computer simulation of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology*, 81, 707-717.

Weir B. et Cockerham C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

- Weisner S. E. B., Graneli W., Ekstam B. (1993): Influence of submergence on growth of seedlings of *Scirpus lacustris* and *Phragmites australis*. *Freshwater Biology*, 29, 371-375.
- White D. A., Hauber D. P. et Hood C. S. (2004): Clonal differences in *Phragmites australis* from the Mississippi river delta. *Southeastern Naturalist*, 3(3), 531-544
- Widén B., Cronberg N. et Widén M. (1994): Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants. A literature survey. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 29, 245-263.
- Wilson M.F. et Traveset A. (2000): The ecology of seed dispersal. In: Fenner M. (ed), *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2nd edition. CABI, Wallingford, 85-107.
- Wroblewska A. et Brzosko E. (2006): The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(2), 245-255.
- Zane L., Bargelloni L. et Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.

## Dodatek A

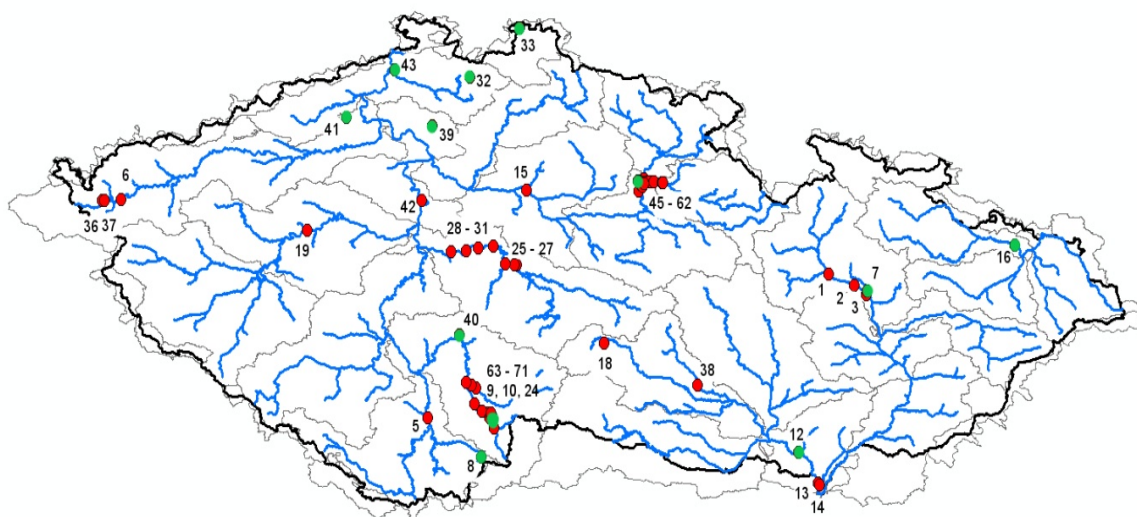
### Přehled lokalit

#### A.1 všechny lokality

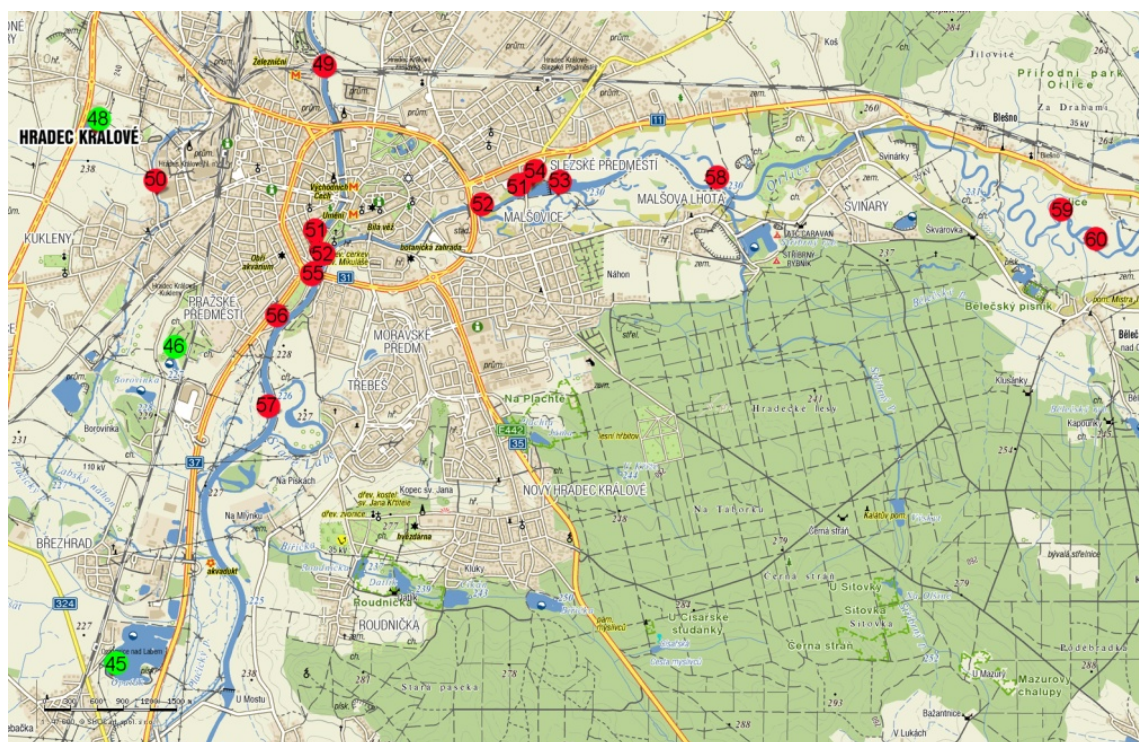
Tab. A.1: Seznam všech populací rákosu obecného. V prvním sloupci je číslo populace, v druhém řeka nebo povodí, ve kterém se populace vyskytuje, ve třetím název lokality. Dále následují souřadnice (severní šířka, východní délka), počet sesbíraných vzorků a přibližná velikost populace v metrech. Umístění jednotlivých populací na mapě je vidět na obrázku A.1, A.2, A.3, A.4.

| pop. | řeka<br>povodí        | lokalita                      | N             | E             | počet | velikost<br>[m] |
|------|-----------------------|-------------------------------|---------------|---------------|-------|-----------------|
| 1    | Morava                | Moravičany                    | 49°44'20,58"  | 16°59'25,98"  | 13    | 20              |
| 2    | Morava                | Střeň                         | 49°40'58,8"   | 17°9'18,6"    | 8     | 5               |
| 3    | Morava                | Chomoutov                     | 49°37'59,1"   | 17°13'52,92"  | 12    | 15              |
| 5    | Vltava                | České Budějovice              | 49°0'28,7"    | 14°27'45,4"   | 10    | 30              |
| 6    | Ohře                  | Kynšperk nad Ohří             | 50°7'8,976"   | 12°31'17,076" | 9     | 15              |
| 7    | Morava                | Chomoutovské jezero           | 49°39'3,539"  | 17°14'4,109"  | 10    | 50              |
| 8    | Stropnice<br>(Vltava) | Lomský rybník                 | 48°48'28,188" | 14°47'58,4"   | 10    | 80              |
| 9    | Lužnice               | rybník Nový vdovec (Třeboň)   | 49°1'52,464"  | 14°50'30,23"  | 10    | 60              |
| 10   | Lužnice               | rybník Vítek (Třeboň)         | 49°2'13"      | 14°48'13,464" | 10    | 50              |
| 12   | Dyje                  | Květné jezero (Dyje)          | 48°49'41,4"   | 16°48'2,412"  | 10    | 40              |
| 13   | Dyje                  | Hraniční cesta (Dyje)         | 48°40'24,6"   | 16°55'31,62"  | 10    | 15              |
| 14   | Kyjovka<br>(Dyje)     | most přes Kyjovku             | 48°39'47,772" | 16°55'58,332" | 10    | 20              |
| 15   | Labe                  | mezi Nymburkem a<br>Poděbrady | 50°10'7"      | 15°4'56"      | 9     | 15              |
| 16   | Opava                 | Křivý rybník                  | 49°53'12"     | 18°10'11"     | 10    | 30              |
| 18   | Jihlava               | Jihlava                       | 49°23'10,5"   | 15°34'30,66"  | 8     | 30              |
| 19   | Berounka              | Zvíkovec                      | 49°57'40,788" | 13°41'58,452" | 7     | 10              |
| 24   | Lužnice               | Černiční rybník               | 49°4'37,764"  | 14°45'21,5"   | 16    | 400             |
| 25   | Sázava                | Kácov                         | 49°47'7,337"  | 15°1'23,017"  | 4     | 10              |
| 26   | Sázava                | Kácov                         | 49°47'10,7"   | 15°0'31,4"    | 10    | 15              |
| 27   | Sázava                | Soběšín                       | 49°47'35,4"   | 14°57'1,8"    | 7     | 15              |
| 28   | Sázava                | Pyskočely                     | 49°52'47,7"   | 14°52'30,2"   | 9     | 15              |
| 29   | Sázava                | Hvězdonice                    | 49°52'26,2"   | 14°46'36,9"   | 9     | 15              |
| 30   | Sázava                | Čerčany                       | 49°51'30,2"   | 14°42'6,8"    | 5     | 10              |
| 31   | Sázava                | Zbořený Kostelec              | 49°51'8,5"    | 14°36'32,2"   | 8     | 15              |
| 32   | Ploučnice             | Velký Valtínov Hrubý rybník   | 50°44'34,376" | 14°43'31,6"   | 58    | 100             |
| 33   | Nisa                  | Černousy Dubový rybník        | 50°59'42,66"  | 15°2'22,8"    | 35    | 150             |
| 36   | Ohře                  | Tršnice                       | 50°6'54,9"    | 12°24'10,1"   | 8     | 80              |
| 37   | Ohře                  | Doubí                         | 50°6'51,4"    | 12°25'4,5"    | 9     | 90              |

|    |              |  |               |               |    |     |
|----|--------------|--|---------------|---------------|----|-----|
| 38 | Oslava       | Náměstí nad Oslavou                          | 49°10'25,855" | 16°9'43,468"  | 4  | 5   |
| 39 | Labe         | Medonosy                                     | 50°29'42,835" | 14°29'19,802" | 4  | 80  |
| 40 | Lužnice      | Tábor - rybník Jordán                        | 49°25'47,826" | 14°39'45,218" | 10 | 200 |
| 41 | Labe         | Milešov - rybník Luční mlýn                  | 50°32'18,645" | 13°56'53,383" | 9  | 20  |
| 42 | Vltava       | Praha - Trója                                | 50°6'50,718"  | 14°25'16,85"  | 6  | 5   |
| 43 | Labe         | Děčín - Folknáře                             | 50°46'50,521" | 14°15'2,583"  | 5  | 30  |
| 45 | Labe         | PCE - Opatovický rybník                      | 50°9'45,376"  | 15°47'29,772" | 11 | 15  |
| 46 | Labe         | HK - Malá Borovinka                          | 50°11'39,296" | 15°48'5,649"  | 11 | 50  |
| 48 | Labe         | HK - rybník u zahrádkářské kolonie           | 50°13'0,527"  | 15°47'23,816" | 12 | 200 |
| 49 | Labe         | HK - u železničního mostu (sever)            | 50°13'19,929" | 15°49'33,179" | 10 | 31  |
| 50 | Labský kanál | HK - Labský kanál                            | 50°12'38,473" | 15°47'57,609" | 4  | 15  |
| 51 | Orlice       | HK - Malšovice - u mostu                     | 50°12'37,371" | 15°51'22,332" | 5  | 15  |
| 52 | Orlice       | HK - Malšovice - slepé rameno                | 50°12'29,682" | 15°50'57,978" | 11 | 30  |
| 53 | Orlice       | HK - Malšovice - u elektrárny (slepé rameno) | 50°12'36,613" | 15°51'41,642" | 9  | 20  |
| 54 | Labe         | HK - Malšovice - u elektrárny                | 50°12'39,728" | 15°51'27,622" | 11 | 30  |
| 55 | Labe         | HK - soutok - u mostu                        | 50°12'6,204"  | 15°49'24,087" | 4  | 5   |
| 56 | Labe         | HK - Pražské předměstí                       | 50°11'50,42"  | 15°49'3,438"  | 10 | 25  |
| 57 | Labe         | HK - u Starého Labe                          | 50°11'17,943" | 15°48'59,051" | 11 | 20  |
| 58 | Orlice       | Malšova Lhota                                | 50°12'38,219" | 15°53'9,461"  | 7  | 15  |
| 59 | Orlice       | Blešno                                       | 50°12'25,059" | 15°56'20,929" | 14 | 60  |
| 60 | Orlice       | Blešno                                       | 50°12'14,015" | 15°56'41,295" | 10 | 50  |
| 61 | Labe         | soutok                                       | 50°12'17,59"  | 15°49'25,696" | 4  | 5   |
| 62 | Labe         | soutok                                       | 50°12'4,735"  | 15°49'26,454" | 4  | 2   |
| 63 | Lužnice      | Majdalena                                    | 48°57'5,157"  | 14°52'39,82"  | 4  | 2   |
| 64 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°0'17,028"  | 14°51'10,551" | 12 | 30  |
| 65 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°0'37,541"  | 14°51'48,692" | 5  | 10  |
| 66 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'5,13"    | 14°51'46,253" | 5  | 10  |
| 67 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'19,114"  | 14°51'41,291" | 5  | 10  |
| 68 | Lužnice      | Nová řeka                                    | 49°1'51,628"  | 14°51'42,185" | 4  | 8   |
| 69 | Lužnice      | Hamr   | 49°9'24,578"  | 14°45'59,651" | 5  | 5   |
| 70 | Lužnice      | Krkavec                                      | 49°10'18,626" | 14°44'13,902" | 10 | 30  |
| 71 | Lužnice      | Veselí n. Luž.                               | 49°11'19,198" | 14°42'7,102"  | 5  | 8   |

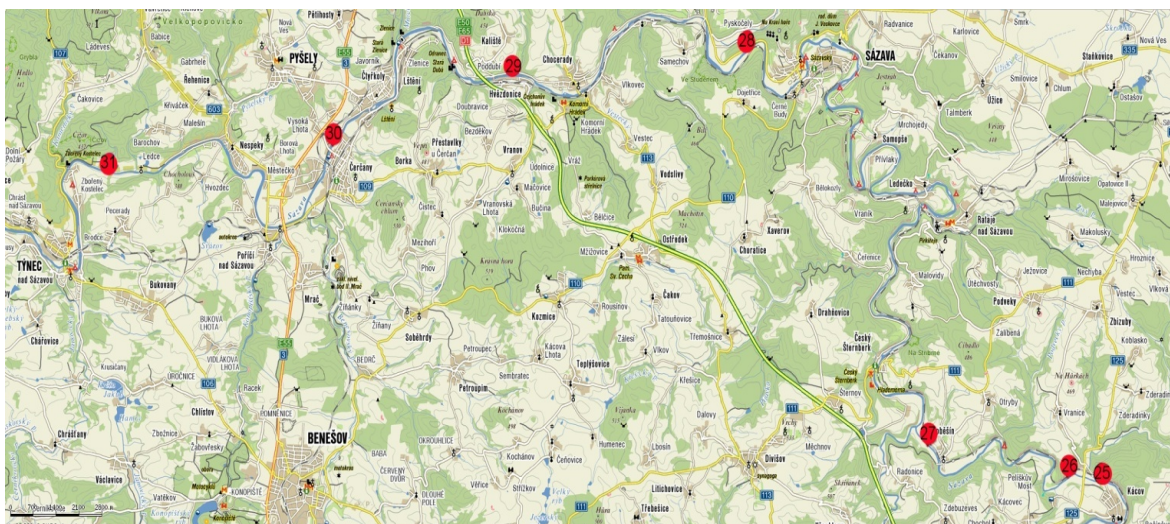


Obrázek A.1: Zobrazení všech analyzovaných populací na mapě. Zeleně jsou vyznačeny rybníční populace, červeně řiční. Podrobná mapa lokality Labe a Orlice u Hradce králové je na obr. A.2, lokality Sázavy na obr. A.3, lokality Lužnice na obr. A.4.

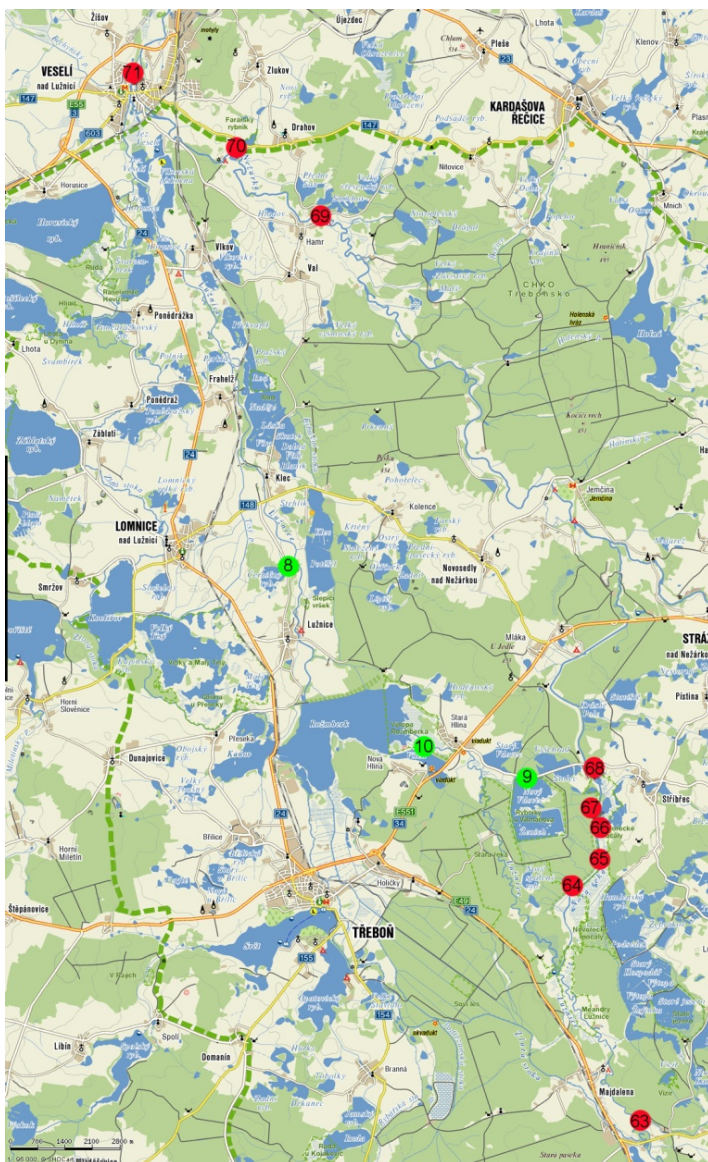


Obrázek A.2: Podrobná mapa populací z okolí Hradce Králové. Zeleně jsou vyznačeny rybníční populace, červeně řiční.





Obrázek A.3: Podrobná mapa populací ze Sázavy.



Obrázek A.4: Podrobná mapa populací z okolí Lužnice. Zeleně jsou vyznačeny rybníční populace, červeně říční.

## A.2 Říční lokality

Tab. A.2: Seznam populací rákosu obecného z říčních lokalit. V prvním sloupci je číslo populace, v druhém řeka nebo povodí, ve kterém se populace vyskytuje, ve třetím název lokality. Dále následují souřadnice (severní šířka, východní délka), počet sesbíraných vzorků a přibližná velikost populace v metrech. Umístění jednotlivých populací na mapě je vidět na obrázku A.1, A.2, A.3, A.4.

| pop. | řeka<br>povodí    | lokality  | N             | E             | počet | velikost<br>[m] |
|------|-------------------|---|---------------|---------------|-------|-----------------|
| 1    | Morava            | Moravičany                                      | 49°44'20,58"  | 16°59'25,98"  | 13    | 20              |
| 2    | Morava            | Střeň   | 49°40'58,8"   | 17°9'18,6"    | 8     | 5               |
| 3    | Morava            | Chomoutov                                       | 49°37'59,1"   | 17°13'52,92"  | 12    | 15              |
| 5    | Vltava            | České Budějovice                                | 49°0'28,7"    | 14°27'45,4"   | 10    | 30              |
| 6    | Ohře              | Kynšperk nad Ohří                               | 50°7'8,976"   | 12°31'17,076" | 9     | 15              |
| 13   | Dyje              | Hraniční cesta (Dyje)                           | 48°40'24,6"   | 16°55'31,62"  | 10    | 15              |
| 14   | Kyjovka<br>(Dyje) | most přes Kyjovku                               | 48°39'47,772" | 16°55'58,332" | 10    | 20              |
| 15   | Labe              | mezi Nymburkem a<br>Poděbrady                   | 50°10'7"      | 15°4'56"      | 9     | 15              |
| 18   | Jihlava           | Jihlava   | 49°23'10,5"   | 15°34'30,66"  | 8     | 30              |
| 19   | Berounka          | Zvíkovec  | 49°57'40,788" | 13°41'58,452" | 7     | 10              |
| 25   | Sázava            | Kácov   | 49°47'7,337"  | 15°1'23,017"  | 4     | 10              |
| 26   | Sázava            | Kácov   | 49°47'10,7"   | 15°0'31,4"    | 10    | 15              |
| 27   | Sázava            | Soběšín   | 49°47'35,4"   | 14°57'1,8"    | 7     | 15              |
| 28   | Sázava            | Pyskočely                                       | 49°52'47,7"   | 14°52'30,2"   | 9     | 15              |
| 29   | Sázava            | Hvězdonice                                      | 49°52'26,2"   | 14°46'36,9"   | 9     | 15              |
| 30   | Sázava            | Čerčany   | 49°51'30,2"   | 14°42'6,8"    | 5     | 10              |
| 31   | Sázava            | Zbořený Kostelec                                | 49°51'8,5"    | 14°36'32,2"   | 8     | 15              |
| 36   | Ohře              | Tršnice   | 50°6'54,9"    | 12°24'10,1"   | 8     | 80              |
| 37   | Ohře              | Doubí   | 50°6'51,4"    | 12°25'4,5"    | 9     | 90              |
| 38   | Oslava            | Náměstí nad Oslavou                             | 49°10'25,855" | 16°9'43,468"  | 4     | 5               |
| 42   | Vltava            | Praha - Trója                                   | 50°6'50,718"  | 14°25'16,85"  | 6     | 5               |
| 49   | Labe              | HK - u železničního mostu<br>(sever)            | 50°13'19,929" | 15°49'33,179" | 10    | 31              |
| 50   | Labský<br>kanál   | HK - Labský kanál                               | 50°12'38,473" | 15°47'57,609" | 4     | 15              |
| 51   | Orlice            | HK - Malšovice - u mostu                        | 50°12'37,371" | 15°51'22,332" | 5     | 15              |
| 52   | Orlice            | HK - Malšovice - slepé<br>rameno                | 50°12'29,682" | 15°50'57,978" | 11    | 30              |
| 53   | Orlice            | HK - Malšovice - u elektrárny<br>(slepé rameno) | 50°12'36,613" | 15°51'41,642" | 9     | 20              |
| 54   | Labe              | HK - Malšovice - u elektrárny                   | 50°12'39,728" | 15°51'27,622" | 11    | 30              |
| 55   | Labe              | HK - soutok - u mostu                           | 50°12'6,204"  | 15°49'24,087" | 4     | 5               |
| 56   | Labe              | HK - Pražské předměstí                          | 50°11'50,42"  | 15°49'3,438"  | 10    | 25              |
| 57   | Labe              | HK - u Starého Labe                             | 50°11'17,943" | 15°48'59,051" | 11    | 20              |

|    |         |                |               |               |    |    |
|----|---------|----------------|---------------|---------------|----|----|
| 58 | Orlice  | Malšova Lhota  | 50°12'38,219" | 15°53'9,461"  | 7  | 15 |
| 59 | Orlice  | Blešno         | 50°12'25,059" | 15°56'20,929" | 14 | 60 |
| 60 | Orlice  | Blešno         | 50°12'14,015" | 15°56'41,295" | 10 | 50 |
| 61 | Labe    | soutok         | 50°12'17,59"  | 15°49'25,696" | 4  | 5  |
| 62 | Labe    | soutok         | 50°12'4,735"  | 15°49'26,454" | 4  | 2  |
| 63 | Lužnice | Majdalena      | 48°57'5,157"  | 14°52'39,82"  | 4  | 2  |
| 64 | Lužnice | Nová řeka      | 49°0'17,028"  | 14°51'10,551" | 12 | 30 |
| 65 | Lužnice | Nová řeka      | 49°0'37,541"  | 14°51'48,692" | 5  | 10 |
| 66 | Lužnice | Nová řeka      | 49°1'5,13"    | 14°51'46,253" | 5  | 10 |
| 67 | Lužnice | Nová řeka      | 49°1'19,114"  | 14°51'41,291" | 5  | 10 |
| 68 | Lužnice | Nová řeka      | 49°1'51,628"  | 14°51'42,185" | 4  | 8  |
| 69 | Lužnice | Hamr           | 49°9'24,578"  | 14°45'59,651" | 5  | 5  |
| 70 | Lužnice | Krkavec        | 49°10'18,626" | 14°44'13,902" | 10 | 30 |
| 71 | Lužnice | Veselí n. Luž. | 49°11'19,198" | 14°42'7,102"  | 5  | 8  |

### A.3 Lokality z vybraných geografických oblastí

Tab. A.3: Seznam populací rákosu obecného z říčních lokalit. V prvním sloupci je číslo populace, v druhém řeka nebo povodí, ve kterém se populace vyskytuje, ve třetím název lokality. Dále následují souřadnice (severní šířka, východní délka), počet sesbíraných vzorků a přibližná velikost populace v metrech. Umístění jednotlivých populací na mapě je vidět na obrázku A.1, A.2, A.3, A.4.

| pop | oblast          | lokalita                          | N             | E             | počet | velikost [m] |
|-----|-----------------|-----------------------------------|---------------|---------------|-------|--------------|
| 1   | Morava          | Moravičany                        | 49°44'20,58"  | 16°59'25,98"  | 13    | 20           |
| 2   |                 | Střeň                             | 49°40'58,8"   | 17°9'18,6"    | 8     | 5            |
| 3   |                 | Chomoutov                         | 49°37'59,1"   | 17°13'52,92"  | 12    | 15           |
| 7   |                 | Chomoutovské jezero               | 49°39'3,539"  | 17°14'4,109"  | 10    | 50           |
| 25  | Sázava + Vltava | Kácov                             | 49°47'7,337"  | 15°1'23,017"  | 4     | 10           |
| 26  |                 | Kácov                             | 49°47'10,7"   | 15°0'31,4"    | 10    | 15           |
| 27  |                 | Soběšín                           | 49°47'35,4"   | 14°57'1,8"    | 7     | 15           |
| 28  |                 | Pyskočely                         | 49°52'47,7"   | 14°52'30,2"   | 9     | 15           |
| 29  |                 | Hvězdonice                        | 49°52'26,2"   | 14°46'36,9"   | 9     | 15           |
| 30  |                 | Čerčany                           | 49°51'30,2"   | 14°42'6,8"    | 5     | 10           |
| 31  |                 | Zbořený Kostelec                  | 49°51'8,5"    | 14°36'32,2"   | 8     | 15           |
| 42  |                 | Praha - Trója                     | 50°6'50,718"  | 14°25'16,85"  | 6     | 5            |
| 49  | Labe + Orlice   | HK - u železničního mostu (sever) | 50°13'19,929" | 15°49'33,179" | 10    | 31           |
| 50  |                 | HK - Labský kanál                 | 50°12'38,473" | 15°47'57,609" | 4     | 15           |
| 51  |                 | HK - Malšovice - u mostu          | 50°12'37,371" | 15°51'22,332" | 5     | 15           |
| 52  |                 | HK - Malšovice - slepé rameno     | 50°12'29,682" | 15°50'57,978" | 11    | 30           |



|    |         |  |               |               |    |    |
|----|---------|--|---------------|---------------|----|----|
| 53 |         | HK - Malšovice - u elektrárny (slepé rameno) | 50°12'36,613" | 15°51'41,642" | 9  | 20 |
| 54 |         | HK - Malšovice - u elektrárny                | 50°12'39,728" | 15°51'27,622" | 11 | 30 |
| 55 |         | HK - soutok - u mostu                        | 50°12'6,204"  | 15°49'24,087" | 4  | 5  |
| 56 |         | HK - Pražské předměstí                       | 50°11'50,42"  | 15°49'3,438"  | 10 | 25 |
| 57 |         | HK - u Starého Labe                          | 50°11'17,943" | 15°48'59,051" | 11 | 20 |
| 58 |         | Malšova Lhota                                | 50°12'38,219" | 15°53'9,461"  | 7  | 15 |
| 59 |         | Blešno                                       | 50°12'25,059" | 15°56'20,929" | 14 | 60 |
| 60 |         | Blešno                                       | 50°12'14,015" | 15°56'41,295" | 10 | 50 |
| 61 |         | soutok                                       | 50°12'17,59"  | 15°49'25,696" | 4  | 5  |
| 62 |         | soutok                                       | 50°12'4,735"  | 15°49'26,454" | 4  | 2  |
| 63 | Lužnice | Majdalena                                    | 48°57'5,157"  | 14°52'39,82"  | 4  | 2  |
| 64 |         | Nová řeka                                    | 49°0'17,028"  | 14°51'10,551" | 12 | 30 |
| 65 |         | Nová řeka                                    | 49°0'37,541"  | 14°51'48,692" | 5  | 10 |
| 66 |         | Nová řeka                                    | 49°1'5,13"    | 14°51'46,253" | 5  | 10 |
| 67 |         | Nová řeka                                    | 49°1'19,114"  | 14°51'41,291" | 5  | 10 |
| 68 |         | Nová řeka                                    | 49°1'51,628"  | 14°51'42,185" | 4  | 8  |
| 69 |         | Hamr   | 49°9'24,578"  | 14°45'59,651" | 5  | 5  |
| 70 |         | Krkavec                                      | 49°10'18,626" | 14°44'13,902" | 10 | 30 |
| 71 |         | Veselí n. Luž.                               | 49°11'19,198" | 14°42'7,102"  | 5  | 8  |
| 8  |         | Lomský rybník                                | 48°48'28,188" | 14°47'58,4"   | 10 | 80 |
| 9  |         | rybník Nový vdovec (Třeboň)                  | 49°1'52,464"  | 14°50'30,23"  | 10 | 60 |
| 10 |         | rybník Vítek (Třeboň)                        | 49°2'13"      | 14°48'13,464" | 10 | 50 |

## **Dodatek B**

### **Protokoly**

Protokoly používané při izolaci DNA, PCR a při přečišťování DNA před odesláním na fragmentační analýzu na automatickém sekvenátoru.

#### **B.1 Izolace DNA metodou CTAB**

1. Cca 0,5 g suchého materiálu (ze silikagelu, ...) vložíme do eppendorfek s kulatým dnem (2ml) a přidáme 5 – 10 skleněných nebo 2-3 wolfram-karbidové kuliček (velikost 3 mm).
2. Zkumavky vložíme do plastových držáků mlýnku Retsch Mixer Mill 400, upevníme a utáhneme pojistku, přiklopíme plastový kryt a drtíme 3 minuty při frekvenci 27 ot./s. (nejde-li materiál rozdrtit, přidáme kuličky a drtíme další 3 minuty).
3. K rozdrčenému materiálu přidáme 700  $\mu$ l roztoku CTAB (s merkaptetanolem) + 5  $\mu$ l RNasy (v mrazicím stojanu), krátce promícháme na vortexu a inkubujeme 30 minut na termobmixeru při 60 °C a 1400 rpm.
4. Po 2 minutách inkubace přidáme ke každému vzorku špetku PVP (polyvinylpyrolidon) na lžičce.
5. Centrifugujeme 6 minut při 13200 rpm, průhledný supernatant přepipetujeme do nových 1,5ml eppendorfek, pracujeme v digestoři.
6. Přidáme 500  $\mu$ l směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1), dobře uzavřené zkumavky třikrát převrátíme a necháme 5 minut stát.
7. Centrifugujeme 6 minut při 13200 rpm, průhledný supernatant (cca 500  $\mu$ l) přepipetujeme do nových 1,5ml eppendorfek, pracujeme v digestoři, kontaminované špičky a 1,5ml eppendorfky vyhazujeme do zvláštní nádoby.
8. Přidáme 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu (z mrazáku), dvakrát převrátíme a necháme 30 minut stát při laboratorní teplotě

9. Centrifugujeme 3 minuty při 13200 rpm. Supernatant v digestoři opatrně slijeme do kádinky (na dně eppendorfký lze vidět drobně matný bílý pellet DNA), otevřené eppendorfký převrátíme dnem nahoru na filtrační papír/ubrousek.
10. Přidáme 400  $\mu\text{l}$  vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku) a inkubujeme 15 minut na termobloku při 37 °C a 1200 rpm.
11. Centrifugujeme 6 minut při 13200 rpm, supernatant opět opatrně slijeme do kádinky.
12. Přidáme 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného 70% ethanolu (z mrazáku) a necháme 5 minut stát.
13. Centrifugujeme 5 minut při 13200 rpm, supernatant opět opatrně slijeme do kádinky a otevřené eppendorfký necháme 10-15 minut stát a vyschnout.
14. Pellet sušíme 15 minut v otevřených eppendorfkách na termobloku při 65 °C., vysušený pellet rozpustíme ve 100  $\mu\text{l}$  TE pufru.
15. Uzavřené eppendorfký inkubujeme 30 minut na termobloku při 37 °C a 600 rpm, krátce promícháme a zcentrifugujeme.
16. DNA uložíme na 24 hodin do lednice, poté je možné skladovat vzorky dlouhodobě při -20 (-80) °C.
17. Kvalitu DNA lze otestovat nanesením 5  $\mu\text{l}$  na 0,8% TAE agarosový gel.

## **B.2 Polymerase chain reaction (PCR)**

Složení reakční směsi pro PCR pro každý z 10 párů fluorescenčně značených primerů ukazuje tabulka B.1. Přidávané primery byli v koncentraci 25  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Reakce byla dostatečně účinná i při polovičním množství z původních 20  $\mu\text{l}$  (Saltonstall, 2003), proto byl z důvodu nižší ceny zvolen objem 10  $\mu\text{l}$ . Reakční směs použitou v případě, že původní směs primerů nenasedla na vzorek, ukazuje třetí sloupec v tab. B.1 (se zvýšeným

množstvím přidané DNA) a čtvrtý sloupec v tabulce B.1 (se zvýšeným množstvím primerů a enzymu). Průběh PCR v termocykleru ukazuje tabulka B.2.

Tabulka B.1: Reakční směs pro PCR připravená pro každý z 10 primerů zvlášť. V prvním sloupci jsou jednotlivé složky reakční směsi, v druhém jejich objem pro poloviční reakci, ve třetím objem složek při zvýšeném množství DNA, ve čtvrtém objem složek při zvýšeném množství primerů a enzymu. Všechny objemy jsou v  $\mu\text{l}$ .

| složka                          | poloviční reakce<br>(10 $\mu\text{l}$ ) | více DNA | více primerů a<br>enzymu |
|---------------------------------|---|----------|--------------------------|
| sterilní voda                   | 6,92                                    | 5,92     | 6,6                      |
| $\text{Mg}^{2+}$                | 0,5                                     | 0,5      | 0,5                      |
| pufr (RedTaq polymerase buffer) | 1                                       | 1        | 1                        |
| dNTP                            | 0,2                                     | 0,2      | 0,2                      |
| forward primer                  | 0,13                                    | 0,13     | 0,2                      |
| reverse primer                  | 0,13                                    | 0,13     | 0,2                      |
| RedTaq polymeráza               | 0,25                                    | 0,25     | 0,5                      |
| DNA                             | 1                                       | 2        | 1                        |

Tabulka B.2: Cyklus pro PC používaný pro amplifikaci mikrosatelitových primerů. Po iniciálním zahřátí následuje 35 cyklů a 15 minut na dosyntetizování zbytků. Teplota držená po ukončení cyklu do otevření víka je 10 °C.

| teplota [°C] | čas       |              |
|--------------|-----------|--------------|
| 94           | 2 minuty  | iniciální    |
| 94           | 30 sekund | 35 opakování |
| 50           | 30 sekund |              |
| 72           | 40 sekund |              |
| 72           | 15 minut  | terminační   |
| 10           | hold      |              |

## **B.3 Přesrážení mikrosatelitových produktů**

### **B.3.1 Přesrážení jednotlivých vzorků**

1. Podle intenzity proužků na agarosovém gelu naředíme produkt PCR reakce pomocí ddH<sub>2</sub>O 1:1 (střední intenzita) až 1:3 (vysoká intenzita). Pokud jsou produkty slabé, neředíme vůbec.
2. Do 1,5 ml eppendorfek přidáme na stěnu 1 µl CH<sub>3</sub>COOH a 1 µl naředěného produktu (podle vzorku a příslušnosti primeru k danému multiplexu – každý vzorek má tedy 2 zkumavky).
3. Multikanálovou pipetou přidáme 25 µl vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku) a promícháme, popřípadě centrifugujeme. Eppendorfky umístíme na 20 minut do mrazáku.
4. Centrifugujeme 30 minut při 4 °C a 12 000 rpm (maximální otáčky). Supernatant opatrně slijeme do kádinky.
5. K pelletce přidáme multikanálovou pipetou 100 µl 70% ethanolu a centrifugujeme 3 minuty při 12 000 rpm.
6. Opatrně slijeme supernatant a otevřené eppendorfky necháme 10 minut stát ve flow boxu.
7. Podle potřeby necháme doschnout v termobloku při 65 °C.
8. Vysušené eppendorfky s pelletkou uložíme do mrazáku.

### **B.3.2 Přesrážení vzorků v platu**

1. Podle intenzity proužků na agarosovém gelu naředíme produkt PCR reakce pomocí ddH<sub>2</sub>O 1:1 (střední intenzita) až 1:3 (vysoká intenzita). Pokud jsou produkty slabé, neředíme vůbec.

2. Do každé jamky plata nanese na stěnu 1  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  a 1  $\mu\text{l}$  naředěného produktu (podle vzorku a příslušnosti primeru k danému multiplexu – každý vzorek má tedy 2 zkumavky, pamatujeme, že sekvestor čte plato ve směru A1, B1, C1, ... a je na to třeba dbát při tvorbě průvodního listu)
3. Multikanálovou pipetou přidáme do každé jamky 25  $\mu\text{l}$  vychlazeného 96% ethanolu (z mrazáku), destičku uzavřeme, zvortexujeme a krátce stočíme. Poté je umístíme na 20 minut do mrazáku.
4. Centrifugujeme 30 minut při 4 °C a 12 000 rpm. Poté opatrně odstraníme víko destičky, přikryjeme ji buničinou, otočíme dnem vzhůru a centrifugujeme 1 minutu při 40 RCF (vyteče ethanol a precipitát zůstane na stěně).
5. Multikanálovou pipetou přidáme 100  $\mu\text{l}$  70% ethanolu, plato uzavřeme a centrifugujeme 5 minut při 12 000 rpm.
6. Opatrně odstraníme víko destičky, přikryjeme ji buničinou, otočíme dnem vzhůru a centrifugujeme 1 minutu při 40 RCF (vyteče ethanol a precipitát zůstane na stěně).
7. Otevřenou destičku necháme stát 10 minut ve flow boxu.
8. Podle potřeby necháme doschnout 5 minut v termobloku při 65 °C.
9. Vysušené a uzavřené destičky uložíme do mrazáku.

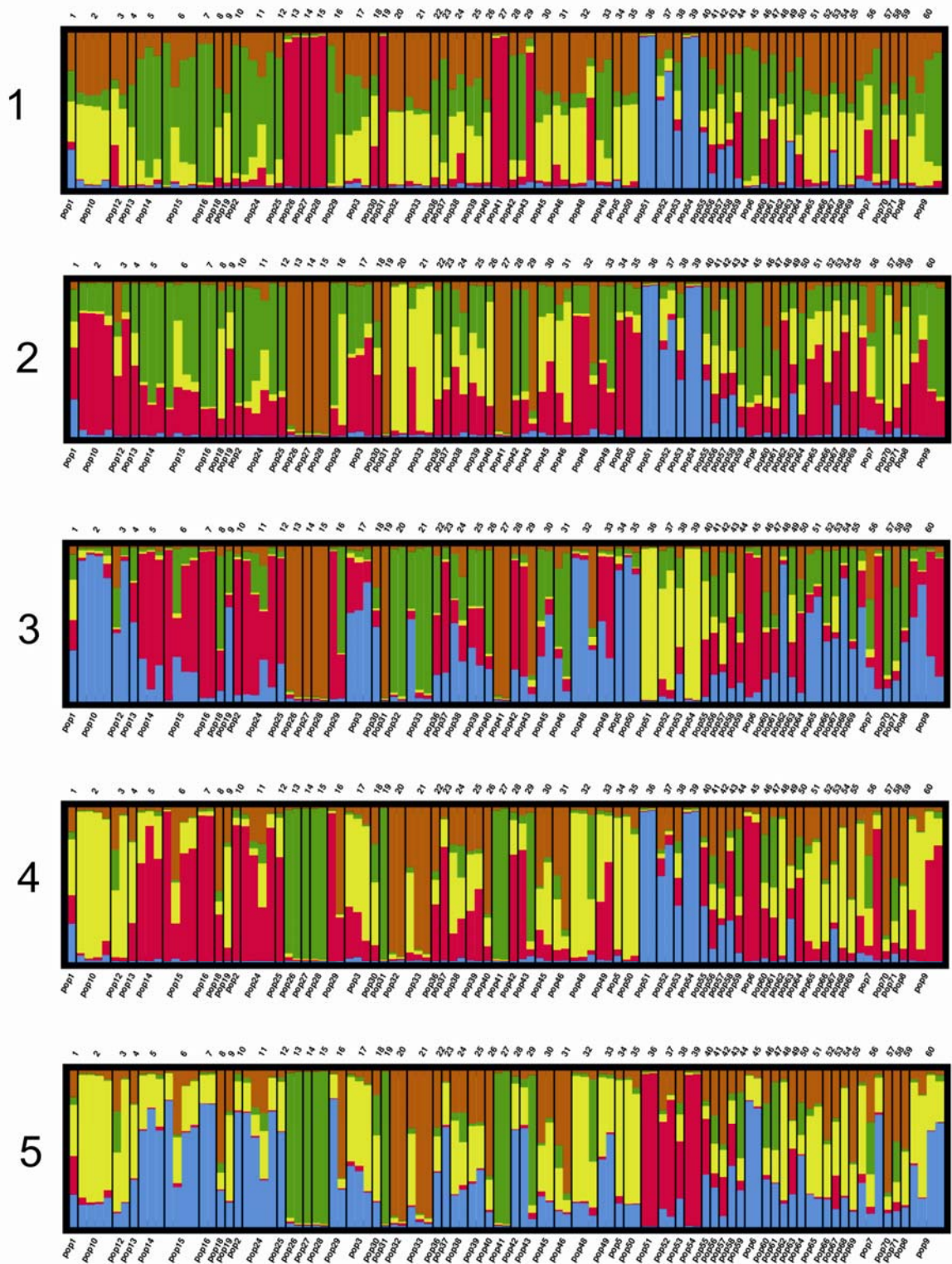
Po přesrážení byly vzorky odeslány na fragmentační analýzu na automatický sekvenátor ABI 3100 Avant v Sekvenační laboratoři Přírodovědecké fakulty UK v Praze (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab/>)

## **Dodatek C**

### **Jednotlivé běhy programu Structure**

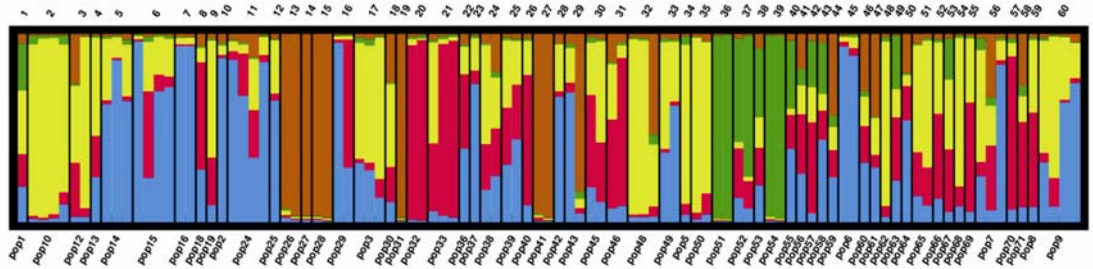
Vyobrazení jednotlivých běhů programu Structure - shlukování jedinců do 5 nebo 4 skupin podle genetické podobnosti. Každý sloupeček představuje jednoho jedince z dané populace. Je-li tento sloupeček jednobarevný, patří tento jedinec 100% do daného barevně odlišeného shluku. Poměr barev ve sloupci odpovídá pravděpodobnosti příslušnosti daného jedince do daných barevně odlišených genetických shluků.

## C.1 Výstup Structure pro 5 skupin

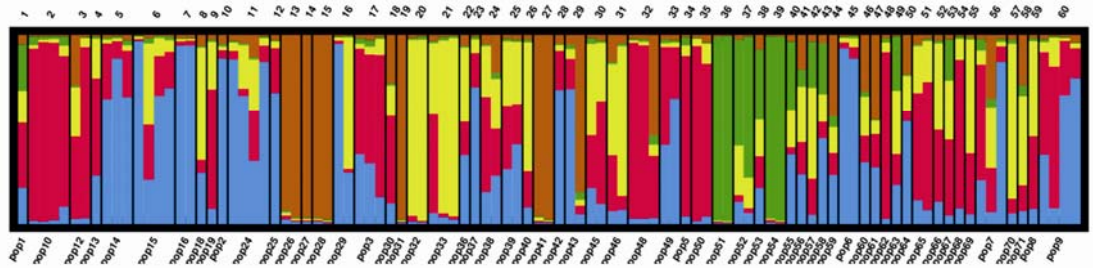




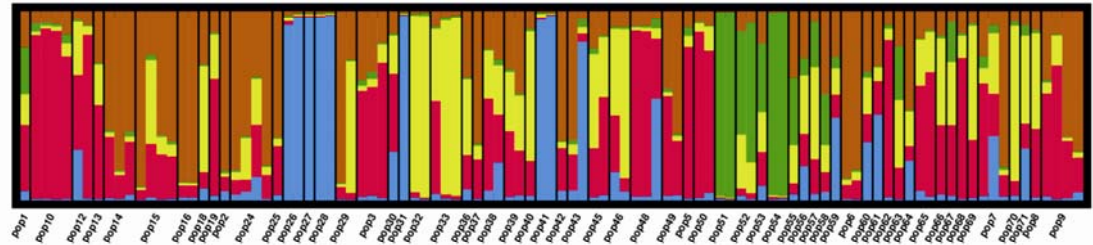
6



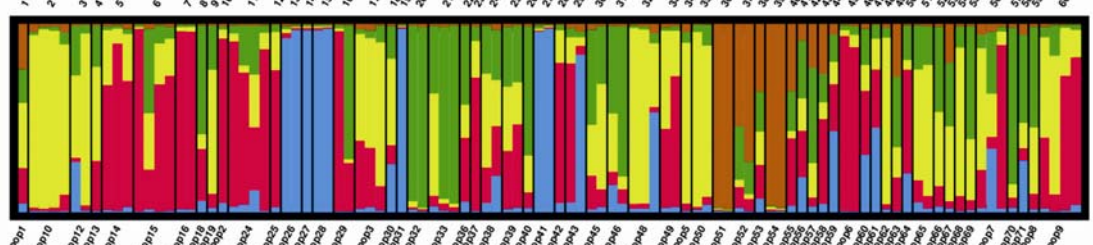
7



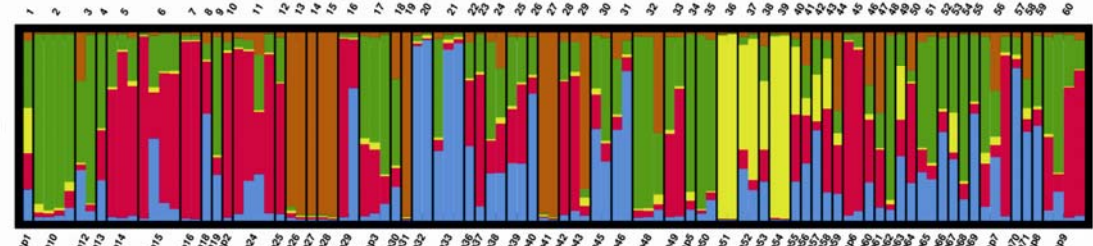
8



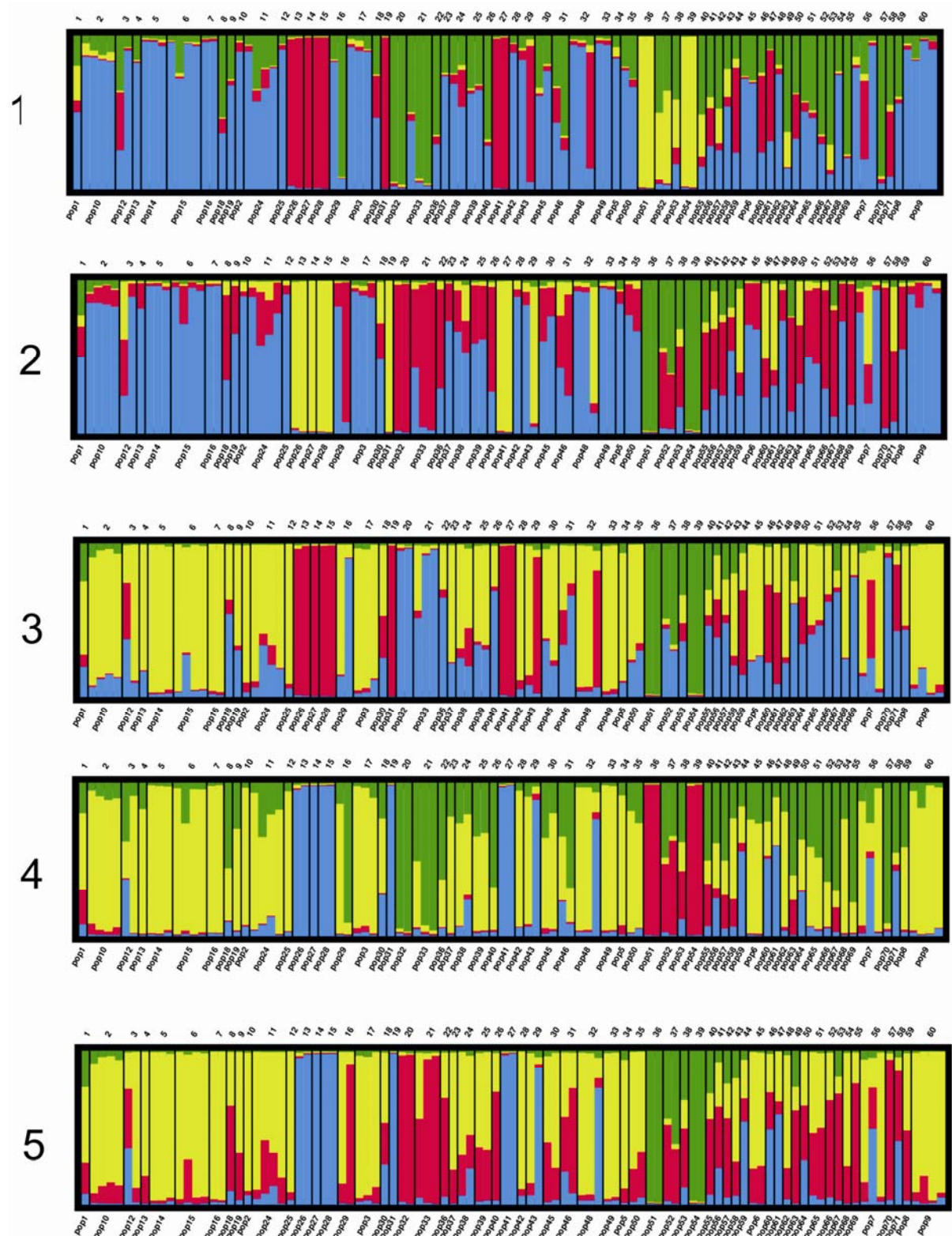
9



10

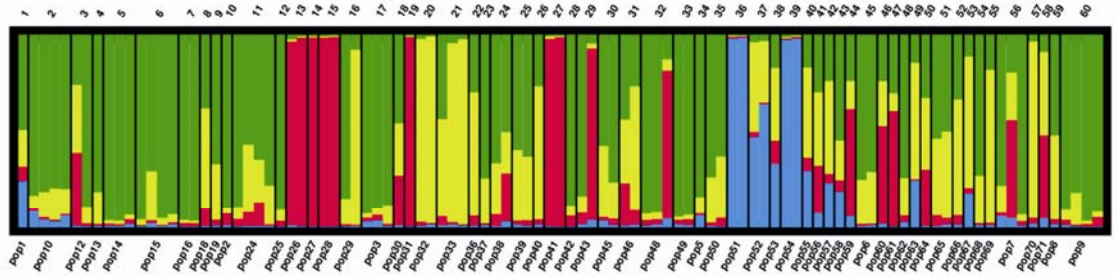


## C.2 Výstup Structure pro 4 skupiny

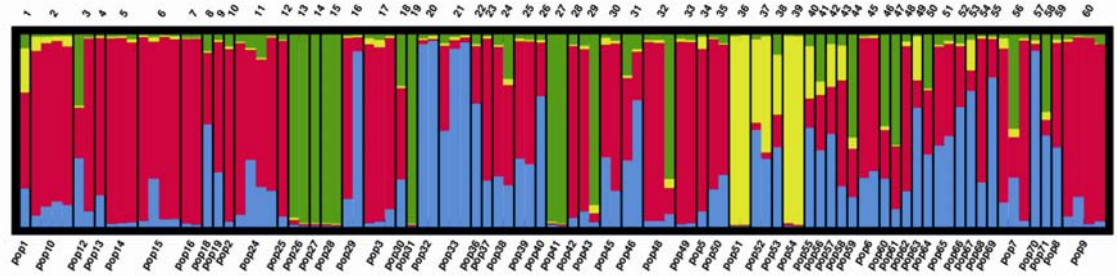




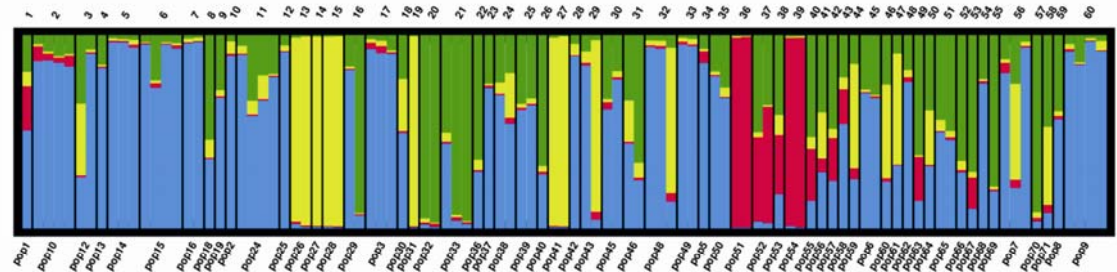
6



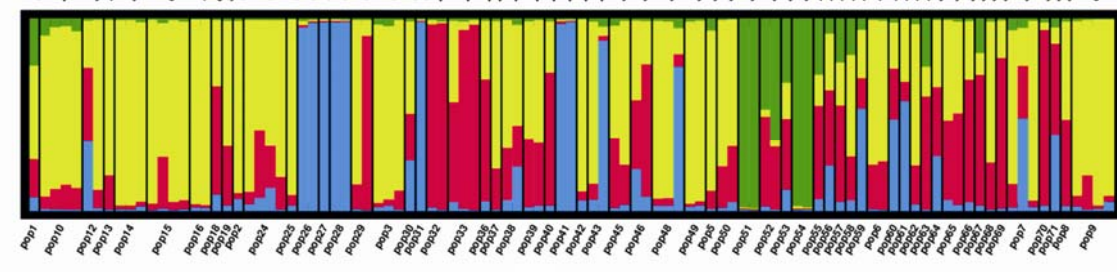
7



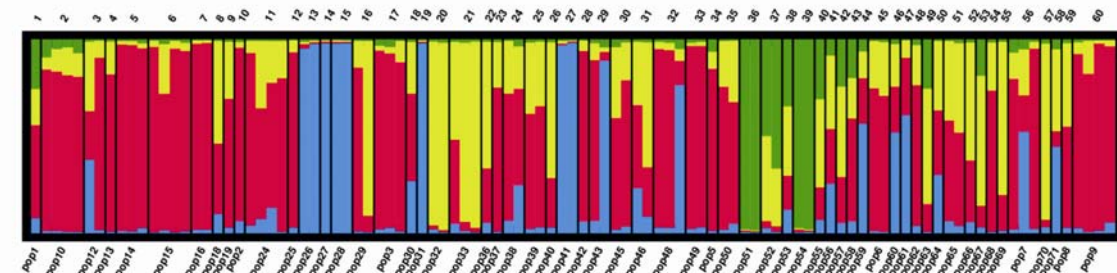
8



9



10



## Dodatek D

### Primární data

Délky jednotlivých alel všech analyzovaných jedinců. V prvním sloupci je číslo jedince, v dalších sloupcích jsou po řadě délky alel pro jednotlivé lokusy (pro multiplex jedna v tab. D.1, pro multiplex dva v tab. D.2. Pro každý lokus jsou uvedeny všechny nalezené alely, pro každý lokus by měly být 4. Tato primární data byla následně upravena podle Becher et al. (2000) nebo Saltonstall (2003) do matic, které sloužily jako vstupní soubory pro jednotlivé analýzy.

#### D.1 datová matice pro multiplex 1

| vzorek | B9 (188-224) |     | G14 (168-198) |             | G4 (266-284) | Y8 (170-193) |  | Y16 (231-298) |     |
|--------|--------------|-----|---------------|-------------|--------------|--------------|--|---------------|-----|
| 1_1    | 197          | 201 | 184           | 190         | 274          | 176          |  | 258           |     |
| 1_5    | 197          | 201 | 184           | 190         | 274          | 176          |  | 258           |     |
| 1_9    | 197          | 201 | 184           | 190         | 274          | 176          |  | 258           |     |
| 1_13   | 197          | 201 | 184           | 190         | 274          | 176          |  | 258           |     |
| 2_1    | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 2_3    | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 2_6    | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 2_8    | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 3_1    | 197          | 205 | 168           | 176 184 188 | 274 276      | 178          |  | 262           |     |
| 3_4    | 205          |     | 168           | 176 184 188 | 274 284      | 178          |  | 262           | 290 |
| 3_9    | 205          | 207 | 168           | 176 188 190 | 258 274 276  | 176 178      |  | 258           |     |
| 3_12   | 205          | 207 | 168           | 176 188 190 | 258 274 276  | 176 178      |  | 258           |     |
| 5_2    | 187          | 197 | 168           | 176 180 190 | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 5_6    | 187          | 197 | 168           | 176 180 190 | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 5_8    | 187          | 197 | 168           | 176 180 188 | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 5_10   | 187          | 197 | 168           | 176 180 188 | 274          | 176          |  | 262           | 290 |
| 6_3    | 197          |     | 176           | 184 188     | 276          | 176 178      |  | 290           |     |
| 6_7    | 197          |     | 176           | 186 188     | 276          | 176 178      |  | 262           | 290 |
| 6_8    | 197          |     | 176           | 186 188     | 276          | 176 178      |  | 262           | 290 |
| 6_9    | 197          |     | 176           | 186 188     | 276          | 176 178      |  | 262           | 290 |
| 7_1    | 203          | 205 | 190           |             | 276 284      | 176 178      |  | 262           | 290 |
| 7_4    | 187          | 201 | 184           | 190         | 274          | 176 178      |  | 258           | 280 |
| 7_8    | 197          | 205 | 188           |             | 274          | 176 178      |  | 262           |     |
| 7_10   | 203          | 205 | 190           |             | 276 284      | 176 178      |  | 262           | 290 |
| 8_1    | 197          | 201 | 168           | 176 184 190 | 274          | 178          |  | 292           |     |
| 8_4    | 197          | 201 | 168           | 176 184 190 | 274          | 178          |  | 292           |     |
| 8_7    | 197          | 201 | 168           | 176 184 190 | 274          | 178          |  | 292           |     |
| 8_10   | 197          | 201 | 168           | 176 184 190 | 274          | 178          |  | 292           |     |

| vzorek | B9 (188-224) |     | G14 (168-198) |     |     |     | G4 (266-284) |     | Y8 (170-193) |     | Y16 (231-298) |     |
|--------|--------------|-----|---------------|-----|-----|-----|--------------|-----|--------------|-----|---------------|-----|
| 9_1    | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 272          | 274 | 178          |     | 262           | 290 |
| 9_3    | 201          | 207 | 168           | 176 | 184 |     | 274          | 276 | 176          | 178 | 262           |     |
| 9_6    | 197          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |
| 9_10   | 187          | 203 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          |     | 262           | 290 |
| 10_1   | 201          | 213 | 168           | 176 | 182 | 190 | 274          |     | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 10_4   | 203          | 219 | 168           | 176 | 182 | 190 | 274          |     | 178          |     | 262           |     |
| 10_7   | 203          | 219 | 168           | 176 | 182 | 190 | 274          |     | 178          |     | 262           |     |
| 10_10  | 197          | 201 | 168           | 176 | 182 | 190 | 274          |     | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 12_1   | 187          | 205 | 168           | 176 | 184 | 190 | 276          | 284 | 176          |     | 258           | 290 |
| 12_4   | 187          | 213 | 168           | 176 | 184 | 190 | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           |     |
| 12_7   | 187          | 213 | 168           | 176 | 184 | 190 | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           |     |
| 12_10  | 187          | 213 | 168           | 176 | 184 | 190 | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           |     |
| 13_1   | 201          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 276 | 176          |     | 290           |     |
| 13_4   | 201          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 276 | 176          |     | 290           |     |
| 13_7   | 201          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 276 | 176          |     | 290           |     |
| 13_10  | 201          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 276 | 176          |     | 290           |     |
| 14_4   | 201          | 205 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          |     | 262           |     |
| 14_5   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 14_9   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 14_10  | 201          | 205 | 168           | 176 | 188 |     | 274          |     | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 15_1   | 197          | 201 | 186           | 188 |     |     | 274          | 278 | 176          |     | 262           | 290 |
| 15_3   | 201          | 205 | 176           | 186 | 192 |     | 274          | 284 | 176          | 178 | 282           | 290 |
| 15_7   | 201          |     | 176           | 186 | 192 |     | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 15_9   | 201          |     | 168           | 182 | 188 |     | 274          | 284 | 176          | 178 | 290           |     |
| 16_3   | 187          | 205 | 176           | 188 |     |     | 274          | 278 | 176          | 178 | 262           |     |
| 16_6   | 187          | 205 | 176           | 184 | 188 |     | 274          |     | 176          |     | 262           | 290 |
| 16_8   | 187          | 205 | 176           | 188 |     |     | 274          | 278 | 176          | 178 | 262           |     |
| 16_10  | 187          | 205 | 176           | 188 |     |     | 274          | 278 | 176          | 178 | 262           |     |
| 18_2   | 199          |     | 168           | 184 |     |     | 274          | 278 | 176          |     | 290           | 258 |
| 18_4   | 199          |     | 168           | 184 |     |     | 274          | 278 | 176          |     | 290           | 258 |
| 18_6   | 199          |     | 168           | 184 |     |     | 274          | 278 | 176          |     | 290           | 258 |
| 18_8   | 199          |     | 168           | 184 |     |     | 274          | 278 | 176          |     | 290           | 258 |
| 19_1   | 187          |     | 176           | 184 | 190 |     | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 19_4   | 187          |     | 176           | 184 | 190 |     | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 19_5   | 187          |     | 176           | 184 | 190 |     | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 19_7   | 187          |     | 176           | 184 | 190 |     | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 24_1   | 205          |     | 176           | 188 | 190 |     | 274          |     | 176          |     | 262           | 290 |
| 24_5   | 187          | 197 | 176           | 188 | 190 |     | 274          |     | 178          |     |               | 290 |
| 24_11  | 197          | 205 | 190           |     |     |     | 274          |     | 176          |     | 258           | 262 |
| 24_16  | 197          | 203 | 176           | 188 | 190 |     | 274          | 276 | 176          | 178 | 262           |     |
| 25_1   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 262           |     |
| 25_4   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 262           |     |

| vzorek | B9 (188-224) |     | G14 (168-198) |             | G4 (266-284) |     | Y8 (170-193) |     | Y16 (231-298) |         |  |
|--------|--------------|-----|---------------|-------------|--------------|-----|--------------|-----|---------------|---------|--|
| 26_3   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290     |  |
| 26_5   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290     |  |
| 26_7   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290     |  |
| 26_10  | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290     |  |
| 27_3   | 187          | 205 | 168           | 176 188 190 | 274          | 282 | 178          | 188 | 258           | 290     |  |
| 27_5   | 187          | 205 | 168           | 176 188 190 | 274          | 282 | 178          | 188 | 258           | 290     |  |
| 27_7   | 187          | 205 | 168           | 176 188 190 | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 28_2   | 187          | 205 | 168           | 188 190     | 274          | 282 | 178          | 188 | 258           | 290     |  |
| 28_4   | 187          | 205 | 168           | 188 190     | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 28_6   | 187          | 205 | 168           | 188 190     | 274          | 282 | 178          | 188 | 258           | 290     |  |
| 28_9   | 187          | 205 | 168           | 188 190     | 274          | 282 | 178          | 188 | 258           | 290     |  |
| 29_1   | 197          | 205 | 186           | 188         | 274          | 276 | 176          |     | 290           |         |  |
| 29_4   | 199          | 209 | 188           | 190         | 284          | 286 | 176          |     | 300           |         |  |
| 29_7   | 199          | 209 | 188           | 190         | 284          | 286 | 176          |     | 300           |         |  |
| 29_9   | 197          | 205 | 186           | 188         | 274          | 276 | 176          |     | 290           |         |  |
| 30_1   | 197          | 203 | 166           | 176 182 190 | 274          | 282 | 178          |     | 262           | 290     |  |
| 30_2   | 197          | 203 | 166           | 176 182 190 | 274          | 282 | 178          |     | 262           | 290     |  |
| 30_4   | 197          | 203 | 166           | 176 182 190 | 274          | 282 | 178          |     | 262           | 290     |  |
| 30_5   | 197          | 203 | 166           | 176 182 190 | 274          | 282 | 178          |     | 262           | 290     |  |
| 31_1   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 31_4   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 31_6   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 31_8   | 187          | 205 | 188           | 190         | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290     |  |
| 32_37  | 187          | 197 | 186           | 192         | 274          | 276 |              | 178 | 280           | 290     |  |
| 32_43  | 187          | 197 | 186           | 192         | 274          | 276 | 178          |     | 280           | 290     |  |
| 32_51  | 189          | 201 | 188           | 194         | 284          | 286 |              | 178 | 290           | 300     |  |
| 32_58  | 187          | 197 | 186           | 192         | 274          | 276 |              | 178 | 280           | 290     |  |
| 33_4   | 205          | 207 | 168           | 176 188     | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 33_15  | 199          | 201 | 168           | 176 188     | 274          | 284 | 178          |     | 262           | 290     |  |
| 33_24  | 199          | 201 | 176           | 190 194     | 294          |     | 178          |     | 272           | 300     |  |
| 33_35  | 205          | 207 | 168           | 176 188     | 274          | 284 | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 36_1   | 197          |     | 186           | 190         | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262     |  |
| 36_3   | 197          |     | 186           | 190         | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262     |  |
| 36_6   | 197          |     | 186           | 190         | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262     |  |
| 36_8   | 197          |     | 186           | 190         | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262     |  |
| 37_1   | 197          |     | 168           | 176 188 190 | 276          |     | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 37_3   | 197          |     | 168           | 176 188 190 | 276          |     | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 37_6   | 197          |     | 168           | 176 188 190 | 276          |     | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 37_9   | 197          |     | 168           | 176 188 190 | 276          |     | 176          | 178 | 262           | 290     |  |
| 38_1   | 207          | 213 | 168           | 176 188 190 | 274          |     | 176          |     | 258           | 262 290 |  |
| 38_3   | 201          |     | 168           | 176 188 190 | 274          |     | 178          |     | 258           | 262 290 |  |
| 39_1   | 197          | 201 | 168           | 176 188 190 | 276          |     | 176          | 178 | 258           | 262 290 |  |
| 39_3   | 197          |     | 168           | 176 188 190 | 278          | 284 | 176          | 178 | 258           | 262 290 |  |

| vzorek | B9 (188-224) |     | G14 (168-198) |     |     |     | G4 (266-284) |     | Y8 (170-193) |     | Y16 (231-298) |     |     |
|--------|--------------|-----|---------------|-----|-----|-----|--------------|-----|--------------|-----|---------------|-----|-----|
| 40_1   | 205          | 221 | 168           | 176 | 190 | 194 | 276          | 278 | 176          | 178 | 258           | 262 | 290 |
| 40_4   | 205          | 221 | 168           | 176 | 190 | 194 | 276          | 278 | 176          | 178 | 258           | 262 | 290 |
| 40_7   | 205          | 221 | 168           | 176 | 190 | 194 | 276          | 278 | 176          | 178 | 258           | 262 | 290 |
| 40_10  | 205          | 221 | 168           | 176 | 190 | 194 | 276          | 278 | 176          | 178 | 258           | 262 | 290 |
| 41_1   | 187          | 205 | 168           | 178 | 190 |     | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 41_4   | 187          | 205 | 168           | 188 |     |     | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290 |     |
| 41_7   | 187          | 205 | 168           | 188 |     |     | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290 |     |
| 41_9   | 187          | 205 | 168           | 178 | 192 |     | 274          | 282 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 42_2   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 262           |     |     |
| 42_5   | 197          | 201 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 262           |     |     |
| 43_1   | 197          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 43_2   | 197          |     | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 43_4   | 187          | 205 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290 |     |
| 43_5   | 187          | 205 | 168           | 176 | 184 | 188 | 274          | 282 | 178          |     | 258           | 290 |     |
| 45_1   | 205          |     | 168           | 176 | 186 | 190 | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 45_11  | 187          | 205 | 168           | 176 | 186 | 190 | 278          | 284 | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 46_1   | 187          | 201 | 168           | 176 | 184 | 186 | 274          | 284 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 46_4   | 187          | 201 | 168           | 176 | 184 | 186 | 274          | 284 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 46_8   | 187          | 201 | 168           | 176 | 184 | 186 | 274          | 284 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 46_11  | 187          | 201 | 168           | 176 | 184 | 186 | 274          | 284 | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 48_1   | 187          | 205 | 168           | 176 | 190 | 192 | 274          | 276 | 176          |     | 262           |     |     |
| 48_5   | 205          |     | 168           | 176 | 190 | 192 | 274          | 276 | 176          |     | 262           | 290 |     |
| 48_9   | 187          | 205 | 168           | 176 | 190 |     | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 48_12  | 187          | 205 | 168           | 176 | 190 | 192 | 274          | 276 | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 49_1   | 197          | 205 | 168           | 176 | 188 |     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 49_4   | 197          | 205 | 168           | 176 | 188 |     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 49_7   | 197          | 205 | 168           | 176 | 188 |     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 49_10  | 197          | 205 | 168           | 176 | 188 |     | 274          |     | 178          |     | 262           |     |     |
| 50_1   | 197          | 203 | 168           | 176 | 182 | 192 | 276          | 282 | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 50_4   | 197          | 203 | 168           | 176 | 182 | 192 | 276          | 282 | 176          | 178 | 262           |     |     |
| 51_1   | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |
| 51_3   | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |
| 52_1   | 197          | 201 | 168           | 190 |     |     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 52_11  | 201          |     | 166           | 190 |     |     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 52_5   | 197          | 201 | 168           | 190 | 190 |     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 52_8   | 201          |     | 166           | 190 |     |     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |     |
| 53_1   | 203          | 205 | 168           | 176 | 188 | 190 | 290          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 53_3   | 203          | 205 | 168           | 176 | 188 | 190 | 290          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 53_6   | 203          | 205 | 168           | 176 | 188 | 190 | 290          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 53_9   | 203          | 205 | 168           | 176 | 188 | 190 | 290          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |     |
| 54_1   | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |
| 54_11  | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |
| 54_4   | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |
| 54_8   | 201          | 205 | 168           | 180 | 190 |     | 290          |     | 178          |     | 290           |     |     |

| vzorek | B9 (188-224) |     | G14 (168-198) |     |         | G4 (266-284) |     | Y8 (170-193) |     | Y16 (231-298) |     |
|--------|--------------|-----|---------------|-----|---------|--------------|-----|--------------|-----|---------------|-----|
| 55_1   | 187          | 205 | 168           | 186 | 188     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 55_3   | 187          | 205 | 168           | 186 | 188     | 290          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 56_1   | 187          | 205 | 184           | 188 | 190     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |
| 56_10  | 187          | 205 | 184           | 188 | 190     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |
| 56_4   | 187          | 205 | 184           | 188 | 190     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |
| 56_7   | 187          | 205 | 184           | 188 | 190     | 274          |     | 176          | 178 | 262           |     |
| 57_1   | 201          |     | 168           | 176 | 190 192 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 57_11  | 201          |     | 168           | 176 | 190 192 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 57_4   | 201          |     | 168           | 176 | 190 192 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 57_8   | 201          |     | 168           | 176 | 190 192 | 274          |     | 176          | 178 | 290           |     |
| 58_1   | 201          | 205 | 188           |     |         | 274          | 278 | 176          |     | 262           | 290 |
| 58_4   | 201          | 205 | 188           |     |         | 274          | 278 | 176          |     | 262           | 290 |
| 58_6   | 201          | 205 | 188           |     |         | 274          | 278 | 176          |     | 262           | 290 |
| 59_1   | 197          | 205 | 168           | 188 |         | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 280 |
| 59_14  | 197          | 205 | 168           | 188 |         | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 280 |
| 59_5   | 197          | 205 | 168           | 188 |         | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 280 |
| 59_9   | 197          | 205 | 168           | 188 |         | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 280 |
| 60_10  | 187          | 197 | 168           | 176 | 184 188 | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |
| 60_4   | 187          | 197 | 168           | 176 | 184 188 | 274          |     | 176          | 178 | 258           | 290 |
| 61_1   | 187          | 197 | 168           | 176 | 188     | 274          |     | 178          |     | 258           | 262 |
| 61_4   | 187          | 197 | 168           | 176 | 188     | 274          |     | 178          |     | 258           | 262 |
| 62_1   | 197          | 205 | 168           | 176 | 184 190 | 274          | 276 | 178          |     | 262           |     |
| 62_3   | 197          | 205 | 168           | 176 | 184 190 | 274          | 276 | 178          |     | 262           |     |
| 63_1   | 201          | 203 | 176           | 180 | 190     | 274          | 276 | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 63_2   | 201          | 203 | 176           | 180 | 190     | 274          | 276 | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 64_1   | 187          | 203 | 176           | 188 |         | 274          |     | 178          |     | 258           | 290 |
| 64_12  | 187          | 203 | 176           | 188 |         | 274          |     | 178          |     | 258           | 290 |
| 64_5   | 187          | 203 | 176           | 188 |         | 274          |     | 178          |     | 258           | 290 |
| 64_9   | 187          | 203 | 176           | 188 |         | 274          |     | 178          |     | 258           | 290 |
| 65_2   | 187          |     | 168           | 176 | 188     | 276          | 284 | 176          | 178 | 262           | 290 |
| 65_5   | 187          | 197 | 168           | 176 | 184 188 | 276          | 284 | 176          |     | 290           |     |
| 66_1   | 187          | 213 | 168           | 176 | 184 188 | 276          | 284 | 176          |     | 290           |     |
| 66_5   | 187          | 213 | 168           | 176 | 184 188 | 276          | 284 | 176          |     | 290           |     |
| 67_1   | 187          | 207 | 168           | 176 | 184 190 | 276          | 282 | 176          |     | 290           |     |
| 67_4   | 187          | 207 | 168           | 176 | 184 190 | 276          | 282 | 176          |     | 290           |     |
| 68_1   | 187          | 207 | 168           | 176 | 182 188 | 274          | 276 | 176          |     | 262           |     |
| 68_3   | 187          | 207 | 168           | 176 | 182 188 | 274          | 276 | 176          |     | 262           |     |
| 69_1   | 197          | 207 | 168           | 188 | 190     | 272          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262 |
| 69_5   | 197          | 207 | 168           | 188 | 190     | 272          | 276 | 176          | 178 | 258           | 262 |
| 70_1   | 207          | 209 | 168           | 176 | 188 190 | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           |     |
| 70_10  | 207          | 209 | 168           | 176 | 188 190 | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           |     |
| 70_4   | 207          | 209 | 168           | 176 | 188 190 | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           |     |
| 70_7   | 207          | 209 | 168           | 176 | 188 190 | 274          | 276 | 176          | 178 | 258           |     |
| 71_1   | 187          | 213 | 168           | 176 | 188 190 | 274          |     | 176          | 178 | 258           |     |
| 71_4   | 187          | 213 | 168           | 176 | 188 190 | 274          |     | 176          | 178 | 258           |     |



## D.2 Datová matice pro multiplex 2

| vzorek | B21 (138 - 199) | B13 (206 - 224) | G11 (142-151) | G22 (159-209) | Y12 (151-196) |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 1_1    | 183 187         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 163       |
| 1_5    | 183 187         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 163       |
| 1_9    | 183 187         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 163       |
| 1_13   | 183 187         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 163       |
| 2_1    | 191             | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 2_3    | 191             | 209             | 140 144       | 193 195       | 179 163       |
| 2_6    | 191             | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 2_8    | 191             | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 3_1    | 183 189         | 209             | 140 144       | 183 193       | 179 161       |
| 3_4    | 183 187         | 209             | 140 144       | 183 193       | 179 161       |
| 3_9    | 183 189         | 209             | 140 144       | 181 203       | 179 163       |
| 3_12   | 183 189         | 209             | 140 144       | 181 203       | 179 163       |
| 5_2    | 145 191         | 209             | 140 144       | 167 181 193   | 179 163       |
| 5_6    | 145 191         | 209             | 140 144       | 167 181 193   | 179 163       |
| 5_8    | 145 191         | 209             | 140 144       | 167 181 193   | 179 163       |
| 5_10   | 145 191         | 209             | 140 144       | 167 181 193   | 179 163       |
| 6_3    | 193 189         | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 6_7    | 193 167         | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 6_8    | 193 167         | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 6_9    | 193 167         | 209             | 140 144       | 195           | 179 163       |
| 7_1    | 183             | 209             | 140 144       | 183 193       | 179 163       |
| 7_4    | 167 183 191     | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 7_8    | 183 187 191     | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 7_10   | 183             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 8_1    | 183             | 209             | 140 144       | 167 181 195   | 179 161       |
| 8_4    | 183             | 209             | 140 144       | 167 181 195   | 179 161       |
| 8_7    | 183             | 209             | 140 144       | 167 181 195   | 179 161       |
| 8_10   | 183             | 209             | 140 144       | 167 181 195   | 179 161       |
| 9_1    | 183 191         | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 9_3    | 183 191         | 209             | 136 140 144   | 195 203       | 179 161       |
| 9_6    | 183 191         | 209             | 140 144       | 195           | 179 161       |
| 9_10   | 183 189         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 10_1   | 183 187 191     | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 10_4   | 183 187 191     | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 10_7   | 193 187 191     | 209             | 140 144       | 181 193       | 179 163       |
| 10_10  | 193 187         | 209 211         | 140 144       | 191 193       | 179 163       |
| 12_1   | 183 191         | 209             | 138 140 144   | 177           | 179 161       |
| 12_4   | 183 191         | 209 211         | 140 144       | 181           | 179 163       |
| 12_7   | 183 191         | 209             | 140 144       | 181           | 179 163       |
| 12_10  | 183 191         | 209 211         | 140 144       | 181           | 179 163       |
| 13_1   | 173 183 191 143 | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 163       |
| 13_4   | 173 183 191 143 | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 163       |
| 13_7   | 173 183 191 143 | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 163       |
| 13_10  | 173 183 191 143 | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 163       |

| vzorek | B21 (138 - 199) | B13 (206 - 224) | G11 (142-151) | G22 (159-209) | Y12 (151-196) |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 14_4   | 189             | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 14_5   | 189             | 209             | 140 144       | 183           | 179 163       |
| 14_9   | 189             | 209             | 140 144       | 183           | 179 163       |
| 14_10  | 189             | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 15_1   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 15_3   | 191             | 209             | 140 144       | 179 193       | 179 163       |
| 15_7   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 15_9   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 16_3   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 16_6   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 16_8   | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 16_10  | 191             | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 18_2   | 189             | 209             | 140 144       | 195 203       | 179 161       |
| 18_4   | 189             | 209             | 140 144       | 195 203       | 179 161       |
| 18_6   | 189             | 209             | 140 144       | 195 203       | 161           |
| 18_8   | 189             | 209             | 140 144       | 195 203       | 161           |
| 19_1   | 191             | 209             | 140 144       | 181 203       | 163           |
| 19_4   | 191             | 209             | 140 144       | 181 203       | 163           |
| 19_5   | 191             | 209             | 140 144       | 181 203       | 163           |
| 19_7   | 191             | 209             | 140 144       | 181 203       | 163           |
| 24_1   | 189 191         | 209             | 140 144       | 179 195       | 179 161       |
| 24_5   | 189 191         | 209             | 140 144       | 179 195       | 179 161       |
| 24_11  | 173 189         | 209             | 140 144       | 181           | 179 161       |
| 24_16  | 193             | 209             | 140           | 183 195       | 179 161       |
| 25_1   | 173             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 25_4   | 173             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 26_3   | 139 191         | 209             | 140 144       | 175 193       | 179 161       |
| 26_5   | 139 191         | 209             | 140 144       | 175 193       | 179 161       |
| 26_7   | 139 191         | 209             | 140 144       | 175 193       | 179 161       |
| 26_10  | 189             | 209             | 140 144       | 175 193       | 179 161       |
| 27_3   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 27_5   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 27_7   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 28_2   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 28_4   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 28_6   | 139 189         | 209             | 140 144       | 177 193       | 179 161       |
| 28_9   | 139 189         | 209             | 140 144       | 177 193       | 179 161       |
| 29_1   | 193             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 29_4   | 193             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 29_7   | 193             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 29_9   | 193             | 209 211         | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 30_1   | 141 183 199     | 209             | 140 144       | 177 183       | 179           |
| 30_2   | 141 183 199     | 209             | 140 144       | 177 183       | 179           |

| vzorek | B21 (138 - 199) | B13 (206 - 224) | G11 (142-151) | G22 (159-209)   | Y12 (151-196) |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| 30_4   | 141 183 199     | 209             | 140 144       | 177 183         | 179           |
| 30_5   | 141 183 199     | 209             | 140 144       | 177 183         | 179           |
| 31_1   | 189             | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 161       |
| 31_4   | 177 189         | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 161       |
| 31_6   | 177 189         | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 161       |
| 31_8   | 189             | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 161       |
| 32_37  | 173 187         | 209 243         | 140 144       | 181 197         | 179 165       |
| 32_43  | 173 187         | 209 243         | 140 144       | 181 197         | 179 165       |
| 32_51  | 173 187         | 209 243         | 140 144       | 181 197         | 179 165       |
| 32_58  | 173 187         | 209 243         | 140 144       | 181 197         | 179 165       |
| 33_4   | 171             | 209             | 140 144       | 193             | 165 161       |
| 33_15  | 189 201         | 215             | 140           | 161 185         | 165 161       |
| 33_24  | 191             | 209             | 140 144       | 183 195         | 165 165       |
| 33_35  | 171             | 209             | 140 144       | 193             | 165 161       |
| 36_1   | 193 195         | 209             | 140 144       | 177 189         | 179 163       |
| 36_3   | 193 195         | 209             | 140 144       | 177 189         | 179 163       |
| 36_6   | 193 195         | 209             | 140 144       | 177 189         | 179 163       |
| 36_8   | 193 195         | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 163       |
| 37_1   | 195             | 209             | 140 144       | 195             | 179 163       |
| 37_3   | 195             | 209             | 140 144       | 195             | 179 163       |
| 37_6   | 195             | 209             | 140 144       | 195             | 179 163       |
| 37_9   | 195             | 209             | 140 144       | 195             | 179 163       |
| 38_1   | 139 173 183 191 | 209             | 140 144       | 195             | 179           |
| 38_3   | 139 183         | 209             | 140 144       | 191 195         | 179           |
| 39_1   | 139 173 191     | 209             | 140 144       | 181 195         | 179           |
| 39_3   | 139 173 191     | 209             | 140 144       | 195             | 179           |
| 40_1   | 139 191         | 209             | 140 144       | 181 195         | 179           |
| 40_4   | 139 191         | 209             | 140 144       | 181 195         | 179           |
| 40_7   | 139 191         | 209             | 140 144       | 181 195         | 179           |
| 40_10  | 139 191         | 209             | 140 144       | 181 195         | 179           |
| 41_1   | 141 183 189 199 | 209             | 140 144       | 177 193         | 179           |
| 41_4   | 141 183 189 199 | 209             | 140 144       | 177 193         | 179           |
| 41_7   | 141 183 189 199 | 209             | 140 144       | 177 193         | 179           |
| 41_9   | 141 183 189 199 | 209             | 140 144       | 177 193         | 179           |
| 42_2   | 199             | 209 211         | 140 144       | 183 195         | 179 161       |
| 42_5   | 199             | 209 211         | 140 144       | 183 195         | 179 161       |
| 43_1   | 139 199         | 209 211         | 140 144       | 193 195         | 179 163       |
| 43_2   | 139 199         | 209 211         | 140 144       | 193 195         | 179 163       |
| 43_4   | 139 183 197     | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 163       |
| 43_5   | 139 183 197     | 209             | 140 144       | 177 193         | 179 163       |
| 45_1   | 183             | 209             | 140 144       | 183 195 197 167 | 179           |
| 45_11  | 183             | 209 211         | 140 144       | 183 193 167     | 179 161       |
| 46_1   | 183             | 209             | 140 144       | 181             | 179 161       |
| 46_4   | 183             | 209             | 140 144       | 181             | 179 161       |

| vzorek | B21 (138 - 199) | B13 (206 - 224) | G11 (142-151) | G22 (159-209) | Y12 (151-196) |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 46_8   | 197             | 209             | 140 144       | 167 177 195   | 179 161       |
| 46_11  | 197             | 209             | 140 144       | 167 177 195   | 179 161       |
| 48_1   | 183 191         | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 48_5   | 183 191         | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 48_9   | 183             | 209             | 140 144       | 195           | 179 165       |
| 48_12  | 183             | 209             | 140 144       | 195           | 179 165       |
| 49_1   | 183 191 197     | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 49_4   | 183 191 197     | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 49_7   | 183 191 197     | 209             | 140 144       | 193           | 179 163       |
| 49_10  | 183 191 197     | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 50_1   | 173 183 191     | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 50_4   | 173 183 191     | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 51_1   | 139 183         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 51_3   | 187 197         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 52_1   | 177             | 209             | 140           | 177 195       | 179 165       |
| 52_11  | 177 187 197     | 209             | 140           | 195           | 179 165       |
| 52_5   | 177             | 209             | 140           | 177 195       | 179 165       |
| 52_8   | 177 187 197     | 209             | 140           | 195           | 179 165       |
| 53_1   | 167 183         | 209             | 140 144       | 183 197       | 179 163       |
| 53_3   | 167 183         | 209             | 140 144       | 183 197       | 179 163       |
| 53_6   | 167 183         | 209             | 140 144       | 183 197       | 179 163       |
| 53_9   | 167 183         | 209             | 140 144       | 183 197       | 179 163       |
| 54_1   | 191 187 139     | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 54_11  | 139 183         | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 54_4   | 139 187 191     | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 54_8   | 187 191 139     | 209             | 140 144       | 193 197       | 179 161       |
| 55_1   | 187 167         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 165       |
| 55_3   | 167 187         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 165       |
| 56_1   | 167 193 197     | 209             | 140 144       | 177 181       | 179 161       |
| 56_10  | 167 193 197     | 209             | 140 144       | 177 181       | 179 161       |
| 56_4   | 167 193 197     | 209             | 140 144       | 177 181       | 179 161       |
| 56_7   | 167 193 197     | 209             | 140 144       | 177 181       | 179 161       |
| 57_1   | 197 199         | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 161       |
| 57_11  | 197 199         | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 161       |
| 57_4   | 197 199         | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 161       |
| 57_8   | 197 199         | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 179 161       |
| 58_1   | 187 199         | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 58_4   | 187 199         | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 58_6   | 187 199         | 209             | 140 144       | 193           | 179 161       |
| 59_1   | 183             | 209             | 140 144       | 177 183 193   | 179 161       |
| 59_14  | 183             | 209             | 140 144       | 177 183 193   | 179 161       |
| 59_5   | 183 199         | 209             | 140 144       | 177 183 193   | 179 161       |
| 59_9   | 183             | 209             | 140 144       | 177 183 193   | 179 161       |

| vzorek | B21 (138 - 199) | B13 (206 - 224) | G11 (142-151) | G22 (159-209) | Y12 (151-196) |
|--------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 60_10  | 183             | 209             | 140 144       | 195           | 179 161       |
| 60_4   | 141 183 191     | 209             | 140 144       | 195           | 179 161       |
| 61_1   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 61_4   | 183             | 209             | 140 144       | 177 195       | 179 161       |
| 62_1   | 141 167 191     | 209             | 140 144       | 193 203       | 179 161       |
| 62_3   | 141 167 191     | 209             | 140 144       | 193 203       | 179 161       |
| 63_1   | 167 189 193     | 209             | 140 144       | 189 197       | 179 163       |
| 63_2   | 167 189 193     | 209             | 140 144       | 189 197       | 179 163       |
| 64_1   | 173 189 199     | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 64_12  | 199 189         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 64_5   | 173 189 199     | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 64_9   | 173 189         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 163       |
| 65_2   | 141 189         | 209 211         | 140 144       | 193           | 179 165       |
| 65_5   | 141 187         | 209             | 140 144       | 193           | 179 165       |
| 66_1   | 141 189         | 209             | 140 144       | 183           | 179 161       |
| 66_5   | 141 189         | 209             | 140 144       | 183 195       | 179 161       |
| 67_1   | 167 187 193     | 209             | 140 144       | 197           | 179 163       |
| 67_4   | 167 187 193     | 209             | 140 144       | 197           | 179 163       |
| 68_1   | 177 187         | 209             | 140 144       | 181 183       | 179 161       |
| 68_3   | 177 187         | 209             | 140 144       | 181 183       | 179 161       |
| 69_1   | 173             | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 165 161       |
| 69_5   | 173             | 209             | 140 144       | 167 193 195   | 165 161       |
| 70_1   | 139 189         | 209             | 140 144       | 167 189 195   | 179 163       |
| 70_10  | 139 189         | 209             | 140 144       | 167 189 195   | 179 163       |
| 70_4   | 139 189         | 209             | 140 144       | 167 189 195   | 179 163       |
| 70_7   | 139 189         | 209             | 140 144       | 167 189 195   | 179 163       |
| 71_1   | 139 167         | 209             | 140 144       | 195           | 179 161       |
| 71_4   | 139 167         | 209             | 140 144       | 195           | 179 161       |